



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/54, 9/12, 1/21, C12Q 1/68, C12P 19/34 // (C12N 9/12, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:19)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/02698</p> <p>(43) 国際公開日 1999年1月21日(21.01.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03037</p> <p>(22) 国際出願日 1998年7月6日(06.07.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/180883 1997年7月7日(07.07.97) JP 特願平10/155759 1998年6月4日(04.06.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 理化学研究所(THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH)[JP/JP] 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama, (JP) 株式会社 ニッポンジーン (NIPPON GENE CO., LTD.)[JP/JP] 〒160-0011 東京都新宿区若葉1丁目4番地 金剛ビル Tokyo, (JP)</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 林崎良英(HAYASHIZAKI, Yoshihide)[JP/JP] 〒305-0074 茨城県つくば市高野台三丁目1-1 理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター内 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 綿引正則(WATAHIKI, Masanori)[JP/JP] 〒930-0288 富山県中新川郡舟橋村上国重25-13 Toyama, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 塩澤寿夫, 外(SHIOZAWA, Hisao et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則 1 3 の 2 に基づいて提出された生物材 料の寄託に関する表示</p>
<p>(54)Title: RNA POLYMERASE</p> <p>(54)発明の名称 RNAポリメラーゼ</p> <p>(57) Abstract An RNA polymerase comprising a wild type RNA polymerase with at least one amino acid modified so as to have a higher ability of incorporating 3'-deoxyribonucleotide or a derivative thereof than that of the corresponding wild type RNA polymerase. Specifically, for example, an RNA polymerase comprising a wild type RNA polymerase wherein at least one amino acid present in the nucleotide bonding site, for example, phenylalanine, is substituted by tyrosine. The RNA polymerase has little or no bias of incorporation between ribonucleotide and 3'-deoxyribonucleotide, between ribonucleotides having different bases, and between deoxyribonucleotides having different bases.</p>		

(57)要約

対応する野性型RNAポリメラーゼの能力と比較して、3'デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体を取り込む能力を増加させるように、少なくとも1つのアミノ酸が修飾された野性型RNAポリメラーゼからなるRNAポリメラーゼを開示する。具体的には、例えば、野性型RNAポリメラーゼのヌクレオチド結合部位中に存在する少なくとも1つのアミノ酸、例えば、フェニルアラニンがチロシンに置換されているRNAポリメラーゼを開示する。本発明のRNAポリメラーゼは、リボヌクレオチドと3'-デオキシリボヌクレオチドとの間、並びに異なる塩基を有するリボヌクレオチド間及び異なる塩基を有するデオキシリボヌクレオチド間での取り込みに対するバイアスが少ないか、或いは全くないRNAポリメラーゼである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストラリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴ
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア
ES スペイン

FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサウ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン

LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レント
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア
共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール

SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴェトナム
YU ユーゴスラビア
ZW ジンバブエ

明細書

RNAポリメラーゼ

技術分野

本発明は、DNA の塩基配列決定法等に有用な変異型 RNA ポリメラーゼに関する。

背景技術

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法は優れた方法であり、年々その利用範囲が広がっている [Randall K. Saiki et al. (1988) Science 239, 487-491]。PCR 法では、1 分子の DNA 断片を増幅することも可能である。PCR 法で増幅した生成物をクローニングすることなくシーケンスする方法（ダイレクト・シーケンス法）も有用な方法である [Corinne Wong et al. (1988) Nature, 330, 384-386]。この方法はライブラリー作製やそのライブラリーのスクリーニングが不要であり、多くのサンプルの配列情報を同時に得られる迅速な方法である。

しかるに、上記ダイレクト・シーケンス法には2つの大きな問題点がある。

一つは、取り込めなかったプライマー及び2' デオキシリボヌクレオシド5' トリフォスフェート（2' d N T P s）が反応系中に残存し、これらがシーケンス反応を妨げることである。従って、従来法では、これら残存するプライマーと2' d N T P s は、シーケンスの前にPCR生成物から除去する必要があった。PCR生

成物の精製方法には種々の方法があり、例えば、電気泳動による精製法、エタノール沈殿法、ゲル濾過法、HPLC精製法がある〔例えば、Dorit R.L et al. (1991) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 11, John Wiley and Sons, New York, 15.2.1-15.2.11 参照〕。しかし、何れの方法でも煩雑である。

2つ目の問題は、PCR 生成物の迅速な再生 (renaturation) である。PCR 生成物が2本鎖DNAに再生してしまうと、1本鎖のテンプレート (鋳型) ではなくなり、プライマーと1本鎖テンプレートとの間のアニーリングを妨げる。再生を最小限にするための方法として、例えば変性後の急冷、1つのプライマーのビオチレーション (biotilation) とストレプトアビジン被覆物へのPCR生成物の吸着、エクソヌクレアーゼの使用、アシンメトリックPCR等が報告されている。例えば、Barbara Bachmannら、1990, Nucleic Acid Res., 18, 1309- に開示されている。しかし、これらの方法の殆どは、長い時間を必要とし、非常に面倒である。

そこでそれらを解決するための新しい方法として、本発明者は、PCR 反応系中に残存する未反応のプライマー及び2' デオキシリボヌクレオシド5' トリフォスフェート (2' dNTPs) を除去することなく、かつPCR反応生成物が迅速に再生する問題を回避するため、変性自体を全く行わないで良い、全く新しいDNAの塩基配列決定方法を提案した〔W096/14434〕。この方法は、T7 RNAポリメラーゼ等のRNAポリメラーゼとRNA転写反応のターミネーター (例えば、3' デオキシリボヌクレオシド5' トリフォスフェート、3' dNTPs) を用いるダイレクト転写シーケンス法である。この

方法によれば、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅したDNA生成物の塩基配列を、プライマー及び2'デオキシリボヌクレオシド5'トリフォスフェート(2' dNTPs)を除去する必要なしにそのままシーケンスに使用できる。さらに、変性自体を全く行わないため、PCR生成物が迅速に再生する問題も回避でき、極めて優れた方法である。

ところが、上記方法について本発明者がさらに研究を行ったところ、より正確な塩基配列データを得るためには、さらに解決すべき課題があることを見出した。

上記塩基配列決定法において、T7 RNAポリメラーゼ等のRNAポリメラーゼは、ATP、GTP、CTP及びUTP又はそれらの誘導体からなるリボヌクレオシド5'トリフォスフェート類並びに3'dATP、3'dGTP、3'dCTP、3'dUTP或いはそれらの誘導体からなる少なくとも1種の3'デオキシリボヌクレオチドの混合物中で反応させる。この反応において、鋳型の配列に相応した塩基を有するリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドが、リボヌクレオチド配列中に逐次取り込まれることで、ポリリボヌクレオチドが合成される。

ところが、リボヌクレオチドに比べて、対応する3'-デオキシリボヌクレオチドやその誘導体は、上記配列に取り込まれにくいこと、さらに、リボヌクレオチドの中及び3'-デオキシリボヌクレオチドの中でもそれぞれ塩基の種類により、配列への取り込まれ方に差があることが判明した。このようにリボヌクレオチドと3'-デオキシ

リボヌクレオチドとの間、並びに異なる塩基を有するリボヌクレオチド間及び異なる塩基を有するデオキシリボヌクレオチド間でのバイアスが存在するため、転写生成物は得られるものの、得られる転写生成物は短鎖であったり、標識されたりリボヌクレオチドからのシグナルにバラツキがあったりして、正確なシーケンスデータを得ることは難しかった。

そこで、本発明の目的は、この取り込み能力に対してヌクレオチドの種類によるバイアスが少ないか、或いは全くない RNA ポリメラーゼを提供することにある。

尚、本発明の説明中において、アミノ酸残基は、慣例により使用されている一文字表記法を用いる。本文中に出てくるアミノ酸のみ、理解のために記述すると、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、プロリン(P)、ロイシン(L)、ヒスチジン(H)である。また、ポリメラーゼ蛋白質の N 末端からの番号を記し、例えば F667 というように表す。これは、このポリメラーゼの 667 番目のアミノ酸残基が Fであることを示し、F 667 Yの記述は、667 番目のアミノ酸残基 F を Y に置換させたことを意味する。

ところで、DNA ポリメラーゼについても、ヌクレオチドの種類により取り込みに差異があることが知られており、さらにこのような取り込みの差異を解消した変異型の DNA ポリメラーゼが知られている〔特開平 8 - 2 0 5 8 7 4 号、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:6339-6345, 1995)〕。

そこには、T7 DNA ポリメラーゼを用いたシーケンス反応におけるヌクレオチドの取り込みに対する均一性は、このポリメラーゼ中の 526 番目のアミノ酸

が生み出しているということが記載されている。さらに、この酵素とその他の DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列の相同性に基づいて、他の DNA ポリメラーゼの相同部位のアミノ酸を変えることにより、取り込みのバイアスが低下すると記載されている。即ち、T7 DNA ポリメラーゼの Y(チロシン)526 が、2'-dNTP と 2', 3' -ddNTP の取り込み効率のバイアスが少ない原因である。更に、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I の F(フェニルアラニン)762、及び *Thermus aquaticus* DNA ポリメラーゼ (Taq DNA ポリメラーゼと一般には呼ばれている) の F(フェニルアラニン)667 が、T7 DNA ポリメラーゼの Y526 の相同なアミノ酸残基であり、このアミノ酸残基を各々、F762Y(チロシン)および F667Y(チロシン)に変化させることで取り込みバイアスが低下すると記載している。

さらに、このような DNA ポリメラーゼに関するデータに基づいて、T7 RNA ポリメラーゼについても、DNA ポリメラーゼで議論されている領域と相同な領域、即ち残基 631-640 に対する修飾は dNTP に対するその特異性を変化させるであろうことを示唆している、と記載している。

しかるに、RNA ポリメラーゼについては、これまでシーケンス法に使用されることはなく、リボヌクレオチドの取り込みに差異があること自体問題にならなかった。さらに、このような状況下、当然のことながら、取り込みの差異を解消した変異型の RNA ポリメラーゼは知られていなかった。事実、上記特開平 8-205874 号公報には、T7 RNA ポリメラーゼを修飾した実例は記載されていない。

さらに、T7 RNA ポリメラーゼのこの領域は、Protein Engineering, 3:461-467, 1990 に示されているモチーフ B 中の、DNA ポリメラーゼの α 型、I 型及び DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (T7RNA ポリメラーゼはこの中に分類される) に特

に保存されたアミノ酸KとYGに挟まれた9～10アミノ酸残基からなる領域に相当すると考えられる。先にDNAポリメラーゼで議論された大腸菌DNAポリメラーゼのアミノ酸残基762あるいはTaq DNAポリメラーゼのアミノ酸残基667のF（フェニルアラニン）は、I型に分類されているDNAポリメラーゼの多くに観察される。しかるに、驚いたことに、DNAポリメラーゼと極めて相同性が高いにも係わらず、T7RNAポリメラーゼでは、上記領域に相当する残基631-640にはF（フェニルアラニン）は存在せず、上記公報の示唆をそのまま実行することはできないことが判明した。

加えて、本発明者は、大腸菌DNAポリメラーゼIのF762の位置は、フィンガー・サブドメインのヘリックス0に存在し、T7 RNAポリメラーゼにおいて、この領域に相当する領域におけるアミノ酸の修飾を検討した。ところがSousa et al.の文献(Nature, 364:593-599, 1993)で示された立体構造上からの、大腸菌DNAポリメラーゼIのヘリックス0に相当するT7 RNAポリメラーゼ中のヘリックスZにもF（フェニルアラニン）がなかった。

このような状況下、本発明者は、この取り込み能力に対してリボヌクレオチド及び3'-デオキシリボヌクレオチドの種類によるバイアスが少ないか、或いは全くないRNAポリメラーゼを提供することを目的として、新たなRNAポリメラーゼを独自に探索した。その結果、野性型RNAポリメラーゼのアミノ酸の一部を修飾することで、3'-デオキシリボヌクレオチドまたはその誘導体を取り込む能力を増加させたRNAポリメラーゼを見いだして本発明を完成した。

尚、後述の説明から明らかになるが、本発明のRNAポリメラーゼ、特にそのアミノ酸修飾位置は、上記特開平8-205874号には全く示唆も教示もされてい

い部位であり、今回、全く新らたに見いだされたものである。

発明の要約

本発明は、対応する野性型 RNA ポリメラーゼの能力と比較して、3' デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体を取り込む能力を増加させるように、少なくとも 1 つのアミノ酸が修飾された野性型 RNA ポリメラーゼからなることを特徴とする RNA ポリメラーゼに関する。

図面の簡単な説明

図 1 は、T7 ファージゲノム上の T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子とコードされている T7 RNA ポリメラーゼのアミノ酸配列（前半）である。上段は、塩基配列、下段はその配列に対応するアミノ酸配列を示した。右端の数字は、塩基配列の場合、DNA 配列データベース GeneBank に登録されている T7 ファージゲノム (Locus T7CG, 39,937 塩基対) の番号を示し、アミノ酸の番号は、T7 RNA ポリメラーゼき最初の M(メチオニン)を 1 として、全長 883 アミノ酸残基からなっていることを示す。

図 2 は、T7 ファージゲノム上の T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子とコードされている T7 RNA ポリメラーゼのアミノ酸配列（後半）である。上段は、塩基配列、下段はその配列に対応するアミノ酸配列を示した。右端の数字は、塩基配列の場合、DNA 配列データベース GeneBank に登録されている T7 ファージゲノム (Locus T7CG, 39,937 塩基対) の番号を示し、アミノ酸の番号は、T7 RNA ポリメラーゼき最初の M(メチオニン)を 1 として、全長 883 アミノ酸残基からなっていることを示す。

図 3 は、現在報告されているファージ由来 RNA ポリメラーゼのアミノ酸配列の比較（前半）である。最上段の T7 RNA ポリメラーゼを基準として、・は T7 RNA ポ

リメラーゼと同一のアミノ酸、－は欠損、最下段の*はすべてのポリメラーゼに共通しているアミノ酸であることを示す。

図4は、現在報告されているファージ由来 RNA ポリメラーゼのアミノ酸配列の比較（後半）である。最上段の T7 RNA ポリメラーゼを基準として、・は T7 RNA ポリメラーゼと同一のアミノ酸、－は欠損、最下段の*はすべてのポリメラーゼに共通しているアミノ酸であることを示す。

図5は、T7 RNA ポリメラーゼの変異部位導入部位の詳細図である。白ぬき文字は、変異導入されたアミノ酸であることを示している。

図6は、T7 RNA ポリメラーゼと T3 RNA ポリメラーゼのアミノ酸配列の比較（前半）である。最上段の T7 RNA ポリメラーゼを基準として、・は同一のアミノ酸、－は欠損、最下段の*は 2 つのポリメラーゼに共通しているアミノ酸であることを示す。

図7は、T7 RNA ポリメラーゼと T3 RNA ポリメラーゼのアミノ酸配列の比較（後半）である。最上段の T7 RNA ポリメラーゼを基準として、・は同一のアミノ酸、－は欠損、最下段の*は 2 つのポリメラーゼに共通しているアミノ酸であることを示す。

図8は、T7 RNA ポリメラーゼの残基 641－667 の前後の配列と、それに対応する領域の T3 RNA ポリメラーゼ、K11 RNA ポリメラーゼ、及び SP6 RNA ポリメラーゼアミノ酸配列を示す。T7 RNA ポリメラーゼについては、残基を全て示したが、対応する T3, K11, SP6 については T7 と同じ残基については・（ドット）で示した。

図9は、野生型 T7 RNA ポリメラーゼを発現するプラスミド、pT7R の構築図である。

図 10 は、変異型 T7RNA ポリメラーゼ F644Y を発現するプラスミド、pT7RF644Y の構築図である。

図 11 は、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子中に制限酵素 XhoI 部位を持つ、pT7R の改良型プラスミド、pT7R-Xho の構築図である。

図 12 は、変異型 T7RNA ポリメラーゼ L665P/F667Y を発現するプラスミド、pT7RL665P/F667Y の構築図である。

図 13 は、変異型 T7 RNA ポリメラーゼによるダイ・ターミネーターの取り込み率の改善を示す。野生型 T7 RNA ポリメラーゼ (WT)、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y (F644Y)、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ L665P/F667Y (F667Y)。

図 14 は、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y によるダイ・ターミネーターの取り込み率の改善を示す。エレクトログラムとして表示した。野生型 T7 RNA ポリメラーゼ (WT)、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y (F644Y)。

図 15 は、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ L665P/F667Y によるダイ・ターミネーターの取り込み率の改善を示す。エレクトログラムとして表示した。野生型 T7 RNA ポリメラーゼ (WT)、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ L665P/F667Y (F667Y)。

図 16 は、シーケンス反応例 野生型 T7 RNA ポリメラーゼ (WT)、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y (F644Y)、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ L665P/F667Y (F667Y) を用いて反応した。何れも同じ領域のシーケンスパターンであるが、野生型 T7 RNA ポリメラーゼ (WT) (最上段) では、ベースコールが正しく機能せず、塩基の間隔が狭まり (塩基の表示が重なってしまい)、正しくシーケンスできていない事が分かる。

図 17 は、変異型 T7RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P/F667Y を発現するプラスミド、pT7R F644Y/L665P/F667Y の構築図である。

図 1 8 (1)～(4)は、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P/F667Y によるダイ・ターミネーターの取り込み率の改善結果をエレクトログラムとして表示した。

発明を実施するための態様

本発明において、「野性型 RNA ポリメラーゼ」とは、天然に存在する全ての RNA ポリメラーゼを意味する。さらに、「野性型 RNA ポリメラーゼ」は、野性型 RNA ポリメラーゼであって、対応する野性型 RNA ポリメラーゼの能力と比較して、3' デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体を取り込む能力を増加させることを目的とする修飾以外のアミノ酸の置換、挿入または欠落を、さらに有するものであることもできる。即ち、野性型 RNA ポリメラーゼを人為的に上記以外の目的で修飾した RNA ポリメラーゼも、上記「野性型 RNA ポリメラーゼ」に含まれる。但し、そのようなアミノ酸の置換、挿入または欠落は、RNA ポリメラーゼとしての活性を維持する範囲で、行われたものであることが適当である。

「野性型 RNA ポリメラーゼ」としては、例えば、T7 ファージ、T3 ファージ、SP6 ファージ、K11 ファージに由来する RNA ポリメラーゼを挙げることができる。但し、これらの RNA ポリメラーゼに限定されるものではない。

また、本発明において「野性型 RNA ポリメラーゼ」は、天然に存在する耐熱性の RNA ポリメラーゼ、及び天然に存在する RNA ポリメラーゼを耐熱性を有するように人為的に修飾した（即ち、アミノ酸の置換、挿入または欠落を行った）ものも包含する。但し、耐熱性を付与するための修飾は、RNA ポリメラーゼとしての活性を維持する範囲で、行われたものであることが適当である。「野性型 RNA ポリメラーゼ」として耐熱性の RNA ポリメラーゼを用いた本発明の

変異型RNAポリメラーゼも耐熱性となる。その結果、例えば、PCR法に併用して、PCR産物を鋳型としてその場で、即ち、PCRと並行して、シーケンス用のRNAフラグメントを合成することも可能である。

T7 RNAポリメラーゼは、極めて特異性の高いプロモーター特異的RNAポリメラーゼとして知られている。T7 RNAポリメラーゼの塩基配列と生産法に関しては Davanloo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81:2035-2039 (1984)に記載されている。さらに大量生産に関しては、Zawadzki et al., Nucl. Acids Res., 19:1948(1991)に既に記載されている。このファージ由来のRNAポリメラーゼは、大腸菌や高等な生物のRNAポリメラーゼと異なり、単一のポリペプチドのみで転写反応を行うことが出来る (Chamberlin et al., Nature, 228:227-231, 1970)。そのため、転写メカニズムを解析する格好の材料となり、沢山の突然変異体が分離され、報告されている。さらに Sousa et al., Nature, 364:593-599, 1993 に結晶解析結果が記載されている。

さらに、その他極めて特異性の高いプロモーター特異的RNAポリメラーゼとして大腸菌に感染するT3ファージ、サルモネラ菌に感染するSP6ファージ及び *Klebsiella pneumoniae* に感染するK11ファージ由来のRNAポリメラーゼの3つがよく知られている。

尚、上記4種のRNAポリメラーゼは、後述するように、アミノ酸の一次構造、プロモーターの配列等、極めて類似している。

本発明のRNAポリメラーゼは、対応する野性型RNAポリメラーゼの能力と比較して、3'デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体を取り込む能力を増加させたものである。前述のように、野性型RNAポリメラーゼでは、リボヌクレオチドに比べて3'デオキシリボヌクレオチドの取り込みが悪く、塩基配

列決定法に用いる妨げとなっていた。それに対して、本発明のRNAポリメラーゼは、3' デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体に対する取り込み能力を、好ましくは野性型の少なくとも2倍増加させるように修飾されている。3' デオキシリボヌクレオチドの取り込みは、3' デオキシリボヌクレオチドに蛍光標識を付した3' デオキシリボヌクレオチド誘導体を用いた場合に特に低下する傾向があるが、本発明のRNAポリメラーゼは、このような3' デオキシリボヌクレオチド誘導体の取り込みも改善できる。

尚、ここで、リボヌクレオチドとは、ATP、GTP、CTP 及び UTP 又はそれらの誘導体からなるリボヌクレオシド5' トリフォスフェート類を意味し、3' デオキシリボヌクレオチドは、3' dATP、3' dGTP、3' dCTP 及び3' dUTP を意味し、その誘導体は、これら3' デオキシリボヌクレオチドに例えば、蛍光標識を付した化合物を意味する。

本発明のRNAポリメラーゼは、対応する野性型RNAポリメラーゼの少なくとも1つのアミノ酸が修飾されたものである。この点について以下に詳細に説明する。

本発明者は、前述のような T7 RNA ポリメラーゼに関する種々の報告を踏まえた上で、T7 RNA ポリメラーゼにおけるリボヌクレオチド等の種類により取り込み効率にバイアスが少ない或いは全くないRNAポリメラーゼ変異体を構築することを検討した。特に、野性型RNAポリメラーゼ上のどのアミノ酸を変異させるのか、さらに、変異として置換を行う場合、どのようなアミノ酸に置換させればよいかについて実際に、種々の変異体を作成して検討し、野性型RNAポリメラーゼの少なくとも1つのアミノ酸を修飾することで3' デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体を取り込む能力を改善することができることを見出して、

本発明の変異型 RNA ポリメラーゼを完成した。

本発明者は、まず、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を挿入した発現プラスミド pT7R を構築し、次に、この発現プラスミド pT7R をベースにして T7 RNA ポリメラーゼの変異体を構築した。即ち、T7 RNA ポリメラーゼの F (フェニルアラニン) 残基を Y (チロシン) 残基に変化させた変異型 T7 RNA ポリメラーゼである F644Y, F646Y, F667Y, F733Y, F782Y, F882Y を構築し、これらの変異体について取り込み能力の比較を行った。さらに、文献 (Sousa., EMBO J., 14:4609-4621 (1995)) には、T7 DNA ポリメラーゼの Y526 に相当する位置である T7 RNA ポリメラーゼの Y639F 変異体の性質を記述している。特に、特開平 8-205874 号に記載された dNTP に対するその特異性を変化させるであろうことを示唆した残基 631-640 に含まれる Y639F 変異体も構築した。

本明細書において、野性型 T7 RNA ポリメラーゼのアミノ酸配列は、遺伝子配列データベースである GeneBank より、accession No. V01148 J02518 X00411 の T7 ファージ DNA 配列 (39,937 塩基対) の塩基番号 3171-5822 にコードされている配列 (図 1 及び 2 参照) を基礎としている。図 1 及び 2 に示す配列の上段は、塩基配列、下段はその配列に対応するアミノ酸配列である。右端の数字は、塩基配列の場合、GeneBank に登録されている T7 ファージゲノム (Locus T7CG, 39,937 塩基対) の番号を示し、アミノ酸の番号は、T7 RNA ポリメラーゼき最初の M (メチオニン) を 1 として、全長 883 アミノ酸残基からなっていることを示す。

尚、このアミノ配列は、上記 Moffatt et al., J. Mol. Biol., 173(2):265-269, 1984 に報告されているアミノ酸配列と同一である。

従って、本明細書における野性型 T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子のアミノ酸配列及び各アミノ酸に付された番号は、この図 1 及び 2 に示される配列及び番号であ

る。さらに、前述のように、上記野性型 T7 RNA ポリメラーゼは、本発明で目的とする修飾以外のアミノ酸の置換、挿入または欠落を、さらに有するものであることもできる。従って、本発明の目的に基づいて変異を導入すべき野性型 RNA ポリメラーゼが、野性型 T7 RNA ポリメラーゼに別の変異を導入したものである場合、特に、そのような変異が、アミノ酸の挿入または欠落である場合、そのような挿入または欠落に応じて、上記アミノ酸番号は変動し、アミノ酸番号が図 1 及び 2 に示す番号とは異なったとしても、T7 RNA ポリメラーゼ活性を維持している限り、そのように挿入または欠落を有する T7 RNA ポリメラーゼも本発明において本発明の目的とする変異を導入する野生型 T7 RNA ポリメラーゼの範疇に含まれる。

T7 RNA ポリメラーゼ以外の RNA ポリメラーゼについてのアミノ酸配列の番号は、図 3 及び 4 に示す配列表に基づき決定される。さらに、本発明で目的とする修飾以外のアミノ酸の置換、挿入または欠落を、さらに有するものであることもできる。従って、これらのアミノ酸配列及びその番号に付いても、T7 RNA ポリメラーゼの場合と同様であり、アミノ酸の挿入または欠落による変異がある場合、そのような挿入または欠落に応じて、上記アミノ酸番号は変動するが、そのような一部に変異を有する野性型の RNA ポリメラーゼも本発明において本発明の目的とする変異を導入する野生型 T7 RNA ポリメラーゼの範疇に含まれる。

T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子は、T7 ファージ DNA を精製後、T7 RNA ポリメラーゼ 遺伝子の N 末端アミノ酸領域上流に特異的なプライマー (T7Rpol-N : 5'-ATA TTT TAG CCA TGG AGG ATT GAT ATA TGA ACA CGA TTA ACA TCG CTA AG -3')、及び C 末端アミノ酸領域下流に特異的なプライマー (T7Rpol-C : 5'-ATA TTT TAG CCA TGG TAT AGT GAG TCG TAT TGA TTT GGC G -3') を合成し、PCR を用いて

増幅、発現ベクター pT7R を構築することができる（実施例 1 参照）。この発現ベクターを用い、大腸菌 DH5 α に形質転換し、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド（IPTG）を添加すると、T7 RNA ポリメラーゼ蛋白質を大量に発現する。

この T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子の配列を、図 1 及び 2 に示すアミノ酸配列と比較したところ、両者完全に一致した。尚、図 1 及び 2 に示すアミノ酸配列と Grachev et al., Bioorg. Kim., 10:824-843, 1984 に報告されているアミノ酸配列とは、図 1 及び 2 に示すアミノ酸配列における 623 番目の Y 及び 665 番目の L が、Grachev et al. の報告におけるアミノ酸配列では、それぞれ H（623 番目）及び P（665 番目）である点で相違していた。上述のように、本発明の変異型 RNA ポリメラーゼのベースとなる野生型 RNA ポリメラーゼは、図 1 及び 2 に示す配列に対して、本発明で目的とする修飾以外のアミノ酸の置換、挿入または欠落を、さらに有するものであることもでき、上記 Grachev et al. の報告している 623 番目及び 665 番目の残基がそれぞれ H 及び P であるアミノ酸配列も、本発明の変異型 RNA ポリメラーゼのベースとなる野生型 RNA ポリメラーゼに含まれる。

発現ベクター pT7R を持つ大腸菌から精製した T7 RNA ポリメラーゼは、イン・ビトロで T7 プロモーターを含んだ DNA 存在下で十分な RNA 合成活性を有していた。この発現プラスミド pT7R をベースにして変異型 T7 RNA ポリメラーゼとして、前述の Y639F, F644Y, F646Y, F667Y, F733Y, F782Y, F882Y を構築し、これらの変異体について取り込み能力の比較を行った。

尚、F644Y 変異を持つ、変異型 T7 RNA ポリメラーゼについては、F644 に対する変異以外に、F644 の近傍の L665 を前述の Grachev et al. の報告に従って P とする変異も導入した。即ち、F644Y/L665P として変異を導入し、L665P の影響を

調べた。また、F667Y 変異を持つ、変異型 T7 RNA ポリメラーゼも、F667 に対する変異以外に、F667 の近傍の L665 を前述の Grachev et al. の報告に従って P とする変異も導入した。即ち、L665P/F667Y として変異を導入した。

さらに、F644Y/L665P/F667Y 変異を導入した変異型 T7 RNA ポリメラーゼも構築した。これらの変異体の取り込み能力の比較も行った。

変異を導入した T7 RNA ポリメラーゼを精製し、プロモーター配列特異的な RNA 合成と ATP、GTP、CTP 及び UTP 又はそれらの誘導体からなるリボヌクレオシド 5' トリフォスフェート類並びに 3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP 或いはそれらの誘導体の取り込み能力を野生型 T7 RNA ポリメラーゼと比較した。結果は後述の表 1 に示す。

その結果、表 1 に示すように、F644Y、F644Y/L665P、L665P/F667Y 及び F644Y/L665P/F667Y は、RNA 合成活性を充分維持し、3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP 或いはそれらの誘導体の取り込みの大幅な改善が見られた。また、F644Y/L665P 変異体の取り込み能力は、F644Y 変異体と同等であった。この結果から、665 のロイシンのプロリンへの置換は、3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP 或いはそれらの誘導体の取り込みに影響がないことが分かる。なお、表 1 には、L665P/F667Y 変異体の結果のみを示すが、F667Y 変異体も、L665P/F667Y 変異体の取り込み能力と同等であった。さらに、F644Y/L665P/F667Y 変異体の取り込み能力が最も高かった。また、表 1 には示していないが、F644Y/F667Y 変異体の取り込み能力は F644Y/L665P/F667Y 変異体のそれとほぼ同等であった。

F782Y 変異体は、RNA 合成活性を保持しており、3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP 或いはそれらの誘導体の取り込み能力も若干改善された。F733Y 変異体は、RNA 合成活性が若干低下したものの、3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3'

dUTP 或いはそれらの誘導体の取り込みの若干の改善が見られた。F646Y 変異体は、RNA 合成活性を保持していたものの 3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP 或いはそれらの誘導体の取り込み能力の改善は見られなかった。F882Y は、RNA 合成活性が著しく低下していたので、表 1 には結果を示さなかった。

さらに、T7 DNA ポリメラーゼの Y526 に相当する位置である T7 RNA ポリメラーゼの Y639F 変異体は、RNA 合成活性を保持していたものの 3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP 或いはそれらの誘導体の取り込み能力の改善は見られなかった。

以上の結果に基づいて、本発明の RNA ポリメラーゼは、特に、ポリメラーゼの「ヌクレオチド結合部位」中に存在する少なくとも 1 つのアミノ酸が修飾された RNA ポリメラーゼであり、このような修飾により、対応するリボヌクレオチドに対して 3' デオキシリボヌクレオチドまたは他のリボヌクレオチド類似体を取り込む能力を増加させることができる。

また、上記「ヌクレオチド結合部位」に存在するアミノ酸は、例えば、野性型 RNA ポリメラーゼのヘリックス Y とヘリックス Z との間のループ中のアミノ酸及び／又はヘリックス Z とヘリックス AA との間のループ中のアミノ酸であることができる。

Sousa et al. の文献 (Nature, 364:593-599, 1993) に示されている立体構造から、鋳型 DNA を包み込むポリメラーゼ分子中のクラフトの内側に面する、ヘリックス Y (T7 RNA ポリメラーゼのアミノ酸残基 625 から 634 に相当) とヘリックス Z (同アミノ酸残基 649 から 658 に相当) に挟まれたループ (同アミノ酸残基 635 から 647 に相当) 及びヘリックス Z とヘリックス AA (同アミノ酸残基 685 から 699 に相当) に挟まれたループ (同アミノ酸残基 659 から 684 に相当) は、極めてヌク

レオチドに近いところに位置するリボヌクレオチド結合部位の一部であると考えられる。本発明では、実際に、このループに相当する領域の 644、646、667 に存在する F 残基を Y 残基に置換した（図 5 参照）。

また、733、782 及び 882 の F 残基は、ループに相当する領域以外の領域に存在し、ポリメラーゼ分子中のクラフトの内側に面すると考えられる。これらの F 残基についても実際に Y 残基に置換した。

さらに本発明は、T 7 ファージ由来の RNA ポリメラーゼのアミノ酸残基 641-667 に対応する領域から選択される領域中のアミノ酸において修飾されている RNA ポリメラーゼに関する。T 7 ファージ由来の RNA ポリメラーゼのアミノ酸残基 641-667 に対応する領域は、前述の「ヌクレオチド結合部位」に相当する。

前記 4 種の RNA ポリメラーゼは、アミノ酸の一次構造、プロモーターの配列等、極めて類似している。図 3 及び 4 に、上記 4 つのファージ由来の RNA ポリメラーゼのアミノ酸配列を比較して示す。この比較より、T7、T3、K11 由来の RNA ポリメラーゼは、極めて類似していることが分かる。特に、図 6 及び 7 に示すように、T7 と T3 ファージ由来の RNA ポリメラーゼのアミノ酸配列は、極めて類似性が高い。T7 と T3 ファージは、共に大腸菌に感染するファージであり、その性質も極めて類似していることと符合する。更にこの 2 つの RNA ポリメラーゼの認識するプロモーター配列も類似しているが、その認識特異性は極めて高いことが知られている。このように T7 RNA ポリメラーゼにおいて得られた結果を、アミノ酸配列の類似する他の RNA ポリメラーゼに適応することは比較的容易にできる。

このような高い相同性から、T 7 ファージ由来の RNA ポリメラーゼ以外の RNA ポリメラーゼにおける、T 7 ファージ由来の RNA ポリメラーゼのアミノ酸

残基 641-667 に対応する領域は、T 3 ファージ由来の RNA ポリメラーゼについては、アミノ酸残基 642-668 であり、K 1 1 ファージ由来の RNA ポリメラーゼについては、アミノ酸残基 664-690 であり、SP6 ファージ由来の RNA ポリメラーゼについては、アミノ酸残基 633-670 である、と言える。前述のように、T7、T3、K11 由来の RNA ポリメラーゼは、極めて類似しており、T7 RNA ポリメラーゼについての結果を、アミノ酸配列の類似する他の由来 RNA ポリメラーゼに適用することができる(図 8 参照)。

上記 RNA ポリメラーゼとしては、例えば、T 7 ファージ由来の RNA ポリメラーゼであって、アミノ酸残基 644 または 667 においてチロシンを有する RNA ポリメラーゼを挙げることができる。また、T 3 ファージ由来の RNA ポリメラーゼであって、アミノ酸残基 645 または 668 においてチロシンを有する RNA ポリメラーゼを例示することもできる。さらに、K 1 1 ファージ由来の RNA ポリメラーゼであってアミノ酸残基 664~669 の間または 690 においてチロシンを有する RNA ポリメラーゼを例示することもできる。さらにまた、さらに、S P 6 ファージ由来の RNA ポリメラーゼであってアミノ酸残基 633~638 の間または 670 においてチロシンを有する RNA ポリメラーゼを例示することもできる。

このようなアミノ酸の修飾は、アミノ酸の変異のみならず、挿入または欠落であることができる。また、アミノ酸の変異は、例えば、天然に存在するアミノ酸の少なくとも 1 つをチロシンに置換することである。さらに、置換されるべき天然に存在するアミノ酸は、例えば、フェニルアラニンであることができる。但し、フェニルアラニンに限定されることはなく、対応するリボヌクレオチドに対して 3' デオキシリボヌクレオチドまたは他のリボヌクレオチド類似体を取り込む能

力を増加させることができるアミノ酸の置換であればよい。

本発明の変異型 RNA ポリメラーゼにおいて、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y、L665P/F667Y 及び F644Y/L665P/F667Y は、RNA 合成活性を充分保持し、さらに 3' dNTPs の取り込み能力が大幅に改善し、野生型で観察された強いバイアスが著しく低下していた。このような優れた特性を有する、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y、L665P/F667Y 又は F644Y/L665P/F667Y を用いることにより、DNA ポリメラーゼを用いる塩基配列決定法を超える実用レベルで、転写生成物による塩基配列決定法が可能になる。

変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y、L665P/F667Y を生産する大腸菌 pT7RF644Y(DH5 α) 及び pT7RL665P/F667Y(DH5 α) は、生命研国際寄託番号がそれぞれ 5998 号(FERM-BP-5998) 及び 5999 号(FERM-BP-5999) として 1997 年 7 月 2 日に寄託済みである。さらに、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P/F667Y を生産する大腸菌 pT7RF644Y/L665P/F667Y(DH5 α) は、生命研国際寄託番号が 6364 号(FERM-BP-6364) として 1998 年 5 月 20 日に寄託済みである。

本発明は、上記本発明の RNA ポリメラーゼを製造する方法であって、RNA ポリメラーゼをコードする核酸分子を用意し、ヌクレオチド塩基配列内の 1 つまたはそれ以上の部位における 1 つまたはそれ以上の塩基を変異させるように該核酸分子に突然変異を起こさせ、次いで変異させた核酸分子により発現される修飾された RNA ポリメラーゼを回収することを含む方法を包含する。RNA ポリメラーゼをコードする核酸分子の用意、核酸分子への突然変異の導入、修飾された RNA ポリメラーゼの回収はいずれも、公知の手法を用いて行うことが出来る。

変異型 T7 RNA ポリメラーゼは、例えば、以下の方法により構築することがで

きる。T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を挿入してある発現ベクターを鋳型にして T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子の C 末端側に相当する制限酵素 Hpa I, Nco I 部位にはさまれる領域を PCR 法を利用して変異を導入した発現プラスミドを構築する。次いで、この発現プラスミドを用い、大腸菌 DH5 α に形質転換し、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加すると、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ蛋白質を大量に発現させることができる。

本発明によれば、リボヌクレオチドに比べて、対応する 3' -デオキシリボヌクレオチドやその誘導体がポリリボヌクレオチド配列に取り込まれにくかったり、リボヌクレオチドの中及び 3' -デオキシリボヌクレオチドの中でもそれぞれ塩基の種類により、配列への取り込まれ方に差があるといった、リボヌクレオチド等の取り込み能力に対するバイアスが少ないか、或いは全くない RNA ポリメラーゼを提供することができる。

さらに、本発明の RNA ポリメラーゼを用いることで、煩雑な操作もなく、DNA ポリメラーゼを用いる塩基配列決定法以上の塩基配列決定を可能にする。また、耐熱性を有する本発明の RNA ポリメラーゼは、例えば、W096/14434 に開示された DNA の塩基配列決定方法において、PCR 法に併用することで、より迅速に DNA の塩基配列の決定を行うことが可能になる。

実施例

以下実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

実施例 1

野生型 T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子のクローニングと発現プラスミドの構築

大腸菌を宿主とする T7 ファージは、以下のように精製した。大腸菌 C600 を LB 培地 (Bacto tryptone 10g, Bacto yeast extract 5g, NaCl 5g を 1 リットルの水に溶かし、pH 7.5 に調整したのち、オートクレーブにて滅菌した培地) 200ml に植菌し、菌体濃度が OD (600nm) =1.0 に達した時点で、多重感染度約 2 で感染させ、その後 OD を経時的に測定し、OD が急激に落ちた時点で遠心操作にて、菌体残査をのぞき、NaCl 及びポリエチレングリコール 6000 をそれぞれ最終濃度、0.5M、及び 10% になるように加え、よく攪拌後、一晚、4℃にて静置し、沈殿を形成させた。この沈殿を遠心操作で集め、SM 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgSO₄, 50 mM NaCl, 0.01% gelatin) にて懸濁した。この T7 ファージの濃縮液を、次に遠心管に丁寧に重層した密度の異なる CsCl 溶液上 (下層から、CsCl 濃度が、1.267g/ml, 0.817g/ml, 0.705g/ml である溶液) に重層し、22,000rpm で 2 時間、遠心することにより、ファージ層を形成させ、このファージの白いバンドを丁寧に分取し、TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA) で透析し、CsCl 成分を除去した。更にこのファージ溶液を、フェノール処理により、ファージ蛋白質を変性させ、T7 ファージのゲノム DNA を精製した。

T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子はこのゲノム DNA、39,937 塩基対の内、3171 から 5822 番目にコードされている [T7 ゲノム遺伝子の全塩基配列については、Dunn らによって既に報告されている (1983, J. Mol. Biol., 166(4):477-535)。但し、若干の訂正がある (GeneBank、accession No. V01148 J02518 X00411 の T7 ファージ DNA 配列参照)]。このゲノム DNA を鋳型として PCR を利用して増幅し、以下のように発現ベクターにクローニングした (図 9 参照)。すなわち、5' 末端に制限酵素 Nco I 切断部位をそれぞれ含み、T7 RNA ポリメラーゼ 遺伝子の N 末端アミノ酸領域上流に特異的なプライマー (T7Rpol-N 5'-ATA TTT TAG CCA TGG

AGG ATT GAT ATA TGA ACA CGA TTA ACA TCG CTA AG -3')、及び C 末端アミノ酸領域下流に特異的なプライマー (T7Rpol-C 5'-ATA TTT TAG CCA TGG TAT AGT GAG TCG TAT TGA TTT GCG -3')を用いて、この酵素遺伝子を PCR 法により増幅した。この DNA フラグメントを Nco I で消化し、1%アガロース電気泳動を行い、目的の DNA フラグメントをアガロースから切り出し、Gene Pure Kit(ニッポンジーン)を用いて精製した。これを Nco I で消化し脱リン酸化した発現ベクター pTrc99a (ファルマシア・バイオテック)と連結することで T7 RNA ポリメラーゼを高発現する pT7R を構築した。野生型 T7 RNA ポリメラーゼを発現するプラスミド pT7R は、大腸菌 DH5 α に形質転換し、抗生物質アンピシリン耐性を示す大腸菌を、培養し、培養液中に IPTG を添加し、発現ベクター pT7R に含まれる Trc プロモーターを稼働させた。IPTG 添加 2 時間後、大腸菌を回収し、全蛋白質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析したところ、T7 RNA ポリメラーゼの分子量である 99kDa 付近に、IPTG を添加した時のみ蛋白質のバンドが検出された。この蛋白質を更に、Zawadzki, V ら、1991, Nucl. Acids Res., 19:1948 に既に記載されている方法を一部改良した方法 (詳しい方法は実施例 3 で例示されている変異型 T7 RNA ポリメラーゼの精製法とほとんど同じ方法で行うことが出来る) で精製したところ、T7 プロモーター特異的に作用する RNA ポリメラーゼの活性を有していた。

実施例 2

変異型 T7 RNA ポリメラーゼを生産するための発現プラスミドの構築

(1) 変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y を生産するための発現プラスミドの構築 (図 10 参照)

野生型 T7 RNA ポリメラーゼ 遺伝子の挿入してある pT7R を鋳型にして、T7 RNA

ポリメラーゼ 遺伝子の C 末端側に相当する制限酵素 Hpa I , Nco I 部位 に挟まれる領域を PCR 法を利用して変異を導入した。更に詳しく例示すると、変異を導入したい塩基を境界として、左右に分け、変異の導入してある プライマー F646Y(+) (5'-GTT GAC GG A AGC CGT ACT CTT TGG AC-3')、 F646Y(-) (5'-GTC CAA AGA GTA CGG CTT CCG TCA AC-3') とそれぞれの制限酵素切断部位を 5' 末端に持つ プライマー T7RNAP-HpaI-N (5'-CGC GCG GTT AAC TTG CTT CCT AG -3')、 pTrc99a-PstI-C (5'-GCA TGC CTG CAG GTC GAC TCT AG -3') を用いて PCR によりそれぞれの DNA フラグメントを増幅した。これらの DNA フラグメントには相補する部分があり、これらを変性、アニール、伸長反応を繰り返すことで目的の変異の導入された DNA フラグメントを作製した。この DNA フラグメントをアガロースゲル電気泳動により、目的の大きさの DNA フラグメントのみを切り出すことで精製し、これを鋳型としてプライマー T7RNAP-HpaI-N と pTrc99a-PstI-C を用いて再増幅し、制限酵素 Hpa I , Pst I で切断した。この DNA は 1%アガロース電気泳動を行い、分離した後、目的の DNA フラグメントを切り出し、精製した。この DNA フラグメントを pT7R の Hpa I , Pst I DNA フラグメントと置き換えることで変異を導入し、大腸菌 DH5 α に形質転換し、変異の導入されたプラスミドを選択し、最終的には塩基配列を確認することで目的の位置に変異が導入されているかどうかを確認した。そして、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y を生産するための発現プラスミド pT7RF644Y を得た。このプラスミドからの変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y の生産は、野生型 T7 RNA ポリメラーゼの生産と同様、本プラスミドを含む大腸菌を培養し、IPTG を添加することにより、発現誘導可能であった。

(2) 変異型 T7 RNA ポリメラーゼ L665P/F677Y を生産するための発現プラスミド

の構築 (図 1 1 及び 1 2 参照)

変異型 T7 RNA ポリメラーゼ L665P/F667Y の構築は、先の F644Y の構築同様、PCR 法をベースにして以下のように行った。

先ず、野生型 T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を持つ発現ベクター pT7R 中の T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子領域内に、変異導入操作を容易にするため制限酵素 XhoI (CTCGAG) を導入した。更に具体的に述べるとプライマー ApaF1 (5'-CAT CTG GTC GCA TTG GGT CAC-3') とプライマー Xho-R (5'-CCA AGT GTT CTC GAG TGG AGA-3') の組み合わせで、また、Xho-F (5'-CTA AGT CTC CAC TCG AGA ACA CTT GG-3') とプライマー Af1III-R (5'-CAG CCA GCA GCT TAG CAG CAG-3') の組み合わせで、各々鋳型として発現ベクター pT7R を用いて、PCR を行った。増幅した前者の DNA フラグメントは制限酵素 ApaI と XhoI で、後者の増幅した DNA フラグメントは制限酵素 Af1III と XhoI でそれぞれ反応し、さらに発現ベクター pT7R を予め ApaI と Af1III で処理して、全てを T4 DNA ライゲースを用いて結合させた。この反応物を大腸菌 DH5 α に形質転換し、抗生物質アンピシリンを含んだ寒天平板上で生育するコロニーを複数得た。このコロニーをいくつか選択し、培養、プラスミド DNA の抽出を行い、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子領域内に制限酵素 XhoI 部位が生まれたプラスミド pT7R-Xho を得た (図 1 0 参照)。この XhoI 部位は、制限酵素 XhoI で処理することによって、切断されること及び DNA の塩基配列決定を行い、その存在を確認可能である。このプラスミド pT7R-Xho を鋳型として、プライマー Xho-R とプライマー 667R (5'-GCT GAG TGT ACA TCG GAC CCT-3') の組み合わせとプライマー 667F (5'-GCT GAG TGT ACA TCG GAC CCT-3') とプライマー Af1IIIR の組み合わせで各々 PCR を行った。この PCR 産物を直接鋳型として、DNA の塩基配列を決定し、プライマー 667R および 667F の配列を確認した後、

それぞれを 2% アガロース電気泳動（アガロースはニッポンジーン製のアガロース X を使用）を行い、目的の大きさの DNA フラグメントを切り出し、Gene Pure Kit を用いて、この DNA フラグメントを精製した。この精製した 2 つの DNA を混合し、鋳型としてプライマー XhoF 及び Af1IIR を用いて PCR を行い、増幅した DNA フラグメントを制限酵素マッピング、DNA 塩基配列の解析により目的のフラグメントであることを確認後、制限酵素 XhoI と Af1II を用いて酵素反応を行い、これを予め制限酵素 XhoI および Af1III で処理したプラスミド pT7R-Xho に T4 DNA ライゲースを用いて結合させた。この反応物を大腸菌 DH5 α に形質転換し、抗生物質アンピシリンを含んだ寒天平板上で生育するコロニーを複数得た。このコロニーをいくつか選択し、培養、プラスミド DNA の抽出を行い、目的の変異が導入されているかを DNA 塩基配列の決定を行い、確認し、最終的に目的の変異型 T7 RNA ポリメラーゼ L665P/F667Y を生産するための発現プラスミド pT7RL665P/F667Y を構築した（図 1 2 参照）。このプラスミドからの変異型 T7 RNA ポリメラーゼ L665P/F667Y の生産は、野生型 T7 RNA ポリメラーゼの生産と同様、本プラスミドを含む大腸菌を培養し、IPTG を添加することにより、発現誘導可能であった。

実施例 3

変異型 T7 RNA ポリメラーゼ の精製

大腸菌に導入した変異型 T7 RNA ポリメラーゼ蛋白質を精製した。

尚、本蛋白質の野生型については既に Chamberlin, M et al. Nature, 228:227-231(1970), Davanloo et al., Proc.Natl. Acad. Sci.USA., 81:2035-2039(1984)に記載されている。さらに大量生産に関しては、Zawadzki, V et al., Nucl. Acids Res., 19:1948(1991)に報告されている。

変異型 T7 RNA ポリメラーゼは基本的に全て同じ方法で精製できる。変異部位

の違いにより、その発現量、カラムクロマトグラフィの挙動が若干異なることもある。以下、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y の精製法を例示する。F644Y の発現ベクター pT7RF644Y を大腸菌 DH5 α に導入、抗生物質アンピシリンを含んだ LB 培地にて、先ず、試験管培養にて OD(600nm) = 0.4~0.6 になったとき、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) を終濃度 0.4mM になるように加え、更に 8 時間培養する。このとき遠心分離により、大腸菌菌体を集め、典型的には 2 リッターの培養液より 10g の湿重量の大腸菌が得られる。この大腸菌菌体を直ぐに使用しない時は、-20℃以下の冷凍庫で保存が可能である。この段階以降の酵素の精製の全ての行程は、特記しない限り、室温以下の温度、好ましくは 0~5℃にて実施する。この大腸菌は、このとき菌体重量の 10 倍の洗浄緩衝液 (20mM Tris-HCl, pH 8.1, 130 mM NaCl, 2mM EDTA Na_2 at 25℃) で洗い、再び遠心分離 (5,000xg、4℃にて 10 分間) し、10 倍量のソニケーション緩衝液 [50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA Na_2 , 5 mM ジチオスレイトール (DTT)、0.1 mM ベンザミジン, 30 μ g/ml フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、10 μ g/ml、バシトラシン] に懸濁し、ソニファイヤー 450 (ブランソン社) を用い、80W、15 分間超音波処理を行い菌体を破砕、粘度を低下させる。続いて、12,000xg、4℃にて 10 分間遠心分離し、細胞残渣を除いた。得られた上清を攪拌しながら、10% 硫酸ストレプトマイシンをゆっくりと滴下し、終濃度 2.0%とした後、更に 30 分間攪拌を続けた。12,000xg、4℃にて 10 分間遠心分離し、沈殿を除去し、粉末硫酸をゆっくり添加しながら攪拌し、沈殿を形成させる。この場合、最初に 30% 飽和硫酸で沈殿を集め (30%硫酸沈殿)、上清は更に 60%飽和硫酸になるように硫酸を攪拌しながら添加し、再び沈殿を形成させ (30-60%硫酸沈殿)、更に上清を 90%飽和硫酸になるように粉末硫酸を加え、4℃にて 1 時間攪拌し、遠心し回

収した。この3つの硫安画分の一部を SDS-アクリルアミドゲル電気泳動を行い、蛋白質を分析したところ、目的の変異型 T7 RNA ポリメラーゼのほとんどは、30-60%硫安画分に存在し、以後この画分を用いて精製を進めた。30-60%硫安画分は少量のカラム緩衝液 (20 mM KPO_4 , pH7.7, 100 mM NaCl, 1mM DTT, 30 $\mu\text{g/ml}$ PMSF) に懸濁し、同じ緩衝液 500ml にて、16 時間透析し、脱塩した。この透析液を、カラム体積 5ml のヘパリン-セファロース (ファルマシア・バイオテック) に付加する。次いで、このカラムを同緩衝液で、280nm の紫外線吸収物質が検出されなくなるまで洗浄し、カラム体積の約 40 倍の体積の同一緩衝液中の 0.1M ~ 0.64M NaCl の直線濃度勾配で溶出する。溶出液は、適当量を試験管に分画して集め、直ぐに SDS-アクリルアミドゲル電気泳動を行い、蛋白質を分析し、目的の変異型 T7 RNA ポリメラーゼと思われる分子量付近に蛋白質が存在する分画を検査する。典型的な例では 0.4M の NaCl 付近に見いだされるはずである。この蛋白質を含む分画を集め、約 1 リットーのカラム緩衝液 (20 mM KPO_4 , pH7.7, 100 mM NaCl, 1mM DTT, 30 $\mu\text{g/ml}$ PMSF) に対して 16 時間透析し、脱塩操作を行った。この透析脱塩した分画を、同緩衝液で予め平衡化した 5ml のカラム体積の Q-セファロース (Q-sepharose, ファルマシア・バイオテック) に付加し、同緩衝液で、280nm の紫外線吸収物質が検出されなくなるまで洗浄し、カラム体積の約 40 倍の体積の同一緩衝液中の 0.1M ~ 0.64M NaCl の直線濃度勾配で溶出する。溶出液は、適当量を試験管に分画して集め、直ぐに SDS-アクリルアミドゲル電気泳動を行い、蛋白質を分析し、目的の変異型 T7 RNA ポリメラーゼと思われる分子量付近に蛋白質が存在する分画を検査する。典型的な例では 0.24M の NaCl 付近に見いだされるはずである。この蛋白質を含む分画を集め、500ml の保存用緩衝液 (50% glycerol, 20 mM KPO_4 , pH7.7, 100 mM NaCl, 1mM DTT, 30 $\mu\text{g/ml}$ PMSF)

に対して 16 時間透析し、使用まで -20°C にて保存する。この状態で、イン・ビトロの RNA 合成活性、或いは混入しているリボヌクレアーゼ活性について試験する。ここでこの方法を例示すると、イン・ビトロ RNA 合成活性については、T7 プロモーターを含むプラスミドを鋳型として用い、野生型 T7 RNA ポリメラーゼの市販品 (BRL・ギブコ社) を標準品として酵素希釈法を用いて、RNA 合成反応を行い、合成した RNA をアガロース電気泳動する事により、おおよその力価を推定した。このとき、合成された RNA の分解の程度も観察されるため、同時に混入リボヌクレアーゼに関しての、簡単な検定も可能である。典型的な例として、以上のような工程を踏まえた精製法で、1 リッターの培養液から 2,500,000 単位の変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y 蛋白質が精製され、この標品にはほとんど RNase の混入は認められない。

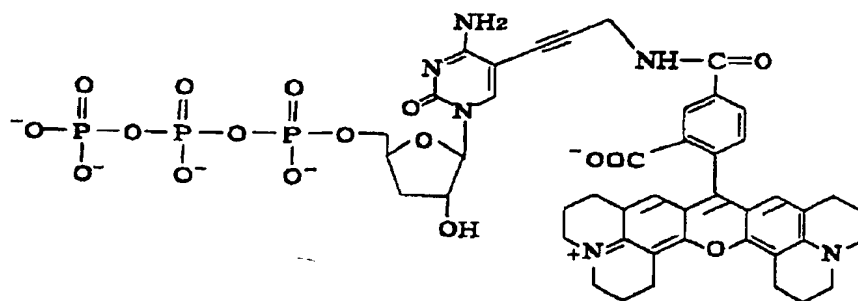
実施例 4

3' dNTP 誘導体の取り込み率の改善

精製された変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y 及び L665P/F667Y を用いて 3' dNTP の取り込み効率を野生型 T7 RNA ポリメラーゼと以下のように比較した。イン・ビトロでの転写反応は、例えば、Melton, D. A, [Nucleic Acids Res., 12: 7035-7056 (1984)] によって示された方法を一部改良して行った。さらに具体的に述べると、T7 プロモーターを有するプラスミドベクター pBluescriptKS(+) (ストラタジーン社) を、制限酵素 PvuII あるいは ScaI で反応し、線状にしたものを鋳型として用い、3' dNTP の誘導体として、W096/14434 に記載された方法を参照して合成したダイ・ターミネーターである 5-カルボキシ-X-ローダミン標識 3'-デオキシシチジン-5'-トリフォスフェートを $150\mu\text{M}$ 、さらに $500\mu\text{M}$ GTP, UTP 及び $250\mu\text{M}$ ATP, CTP, 8mM MgCl_2 , 2mM spermidine-(HCl) $_3$, 5mM DTT, 40mM

Tris/HCl pH 8.0 (BRL, ギブコ社) の条件下に、野生型 T7 RNA ポリメラーゼ (BRL, ギブコ社あるいはニッポンジーン製)、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y あるいは L665P/F667Y 25 単位を加えて、合計反応体積 $10\mu\text{l}$ として、 37°C で 1 時間反応を行った。次に反応産物中に残存している未反応のダイ・ターミネーターを除去するため、セファデックス G-50 カラム (ファルマシア・バイオテック) を用いたゲル濾過法により転写産物を精製し、精製産物は遠心式エバポレーターを用いて蒸発乾固した。

上記 5-カルボキシ-X-ローダミン標識 3'-デオキシシチジン-5'-トリフォスフェートは、以下の化学式で示される化合物である。



乾燥させた反応物を株式会社パーキンエルマージャパンの ABI PRISM 377 DNA Sequencing System 取り扱い説明書 Ver. 1.0 に従い、ホルムアミド/EDTA/Blue dextran loading buffer $6\mu\text{l}$ に溶解し、そのうち $2\mu\text{l}$ を、6M 尿素/4%ロングレンジャーTM アクリルアミド溶液 (FMC) を含むシークエンス解析用変性ゲルを用い、ABI 377 DNA Sequencer 及び解析プログラムにより解析した。その結果を図 13 にゲル・イメージとして示す。変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y は

野生型 T7 RNA ポリメラーゼに較べて、約 3 倍のシーケンスラダーが得られることが判明し、約 700 塩基の転写産物も確認された。

更に図 1 4 及び図 1 5 に、それぞれ F644Y 及び L665P/F667Y を用いて得られたシーケンスラダーのピーク強度を野生型 T7 RNA ポリメラーゼを用いて得られたピーク強度と対比して示す。この対比から、変異型酵素のピークの高さは、野生型と較べてバラツキが少なく、さらに強いシグナルをもつピークが得られた。これは、F644Y あるいは L665P/F667Y の変異によって、この場合、3' dCTP 誘導体の取り込み率が改善されたことを示し、さらに、この変異型 T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応が、既に存在する DNA ポリメラーゼによる塩基配列決定法のデータ生産力に匹敵するラダー伸長反応特性を持っていることを示している。

実施例 5

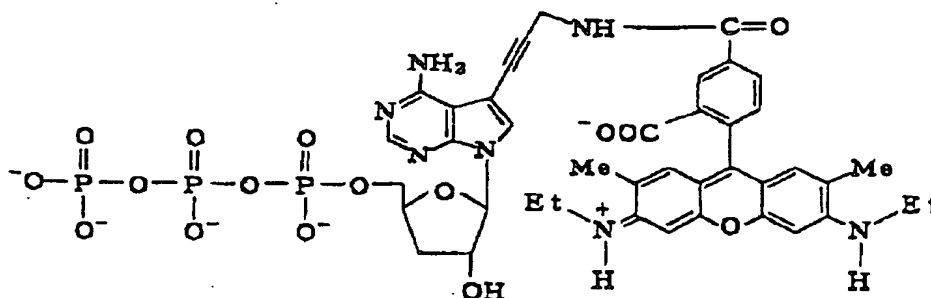
変異型 T7 RNA ポリメラーゼを用いたダイ・ターミネーター法によるシーケンス反応例

ダイ・ターミネーター法によるシーケンス反応を、精製された変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y 及び L665P/F667Y と野生型 T7 RNA ポリメラーゼについて以下のように比較した。

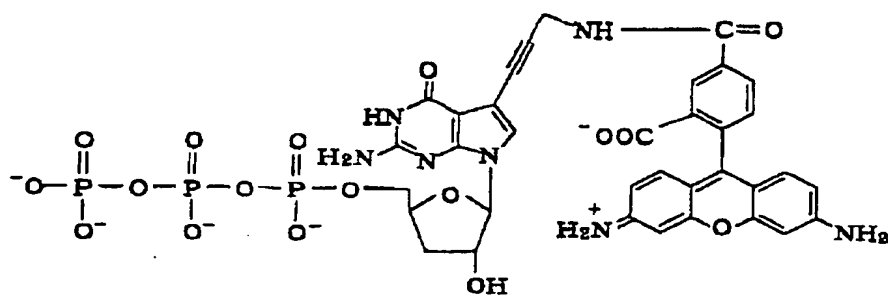
イン・ビトロでの転写反応は、実施例 4 で例示した、Melton, D. A. (1984, Nucleic Acids Res., 12: 7035-7056) によって示された方法を用いた。さらに具体的に述べると、T7 プロモーターを有するプラスミドベクター pBluescriptKS(+) を、制限酵素 PvuII あるいは ScaI で反応し、線状にしたものを鋳型として用い、3' dNTP の誘導体として、W096/14434 に記載された方法を参照して合成したダイ・ターミネーター、5-カルボキシローダミン 6G 標識 3' -デオキシアデノン-5'-トリフォスフェート、5-カルボキシローダミン 110 標識 3' -デオキシグアノシン

-5'-トリフォスフェート, 5-カルボキシ-X-ローダミン標識 3'-デオキシシチジン-5'-トリフォスフェート, 5-カルボキシテトラメチルローダミン標識 3'-デオキシウリジン-5'-トリフォスフェート, さらに 500 μ M GTP, UTP 及び 250 μ M ATP, CTP, 8mM MgCl_2 , 2mM spermidine-(HCl) $_3$, 5mM DTT, 40mM Tris/HCl pH 8.0 (BRL, ギブコ社) の条件下に、野生型 T7 RNA ポリメラーゼ (BRL, ギブコ社 あるいはニッポンジーン製) あるいは変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y 25 単位を加えて、合計反応体積 10 μ l として、37°C で 1 時間反応を行った。次に反応産物中に残存している未反応のダイ・ターミネーターを除去するため、セファデックス G-50 カラム (ファルマシア・バイオテク製) を用いたゲル濾過法により転写産物を精製し、精製産物は遠心式エバポレーターを用いて蒸発乾固した。

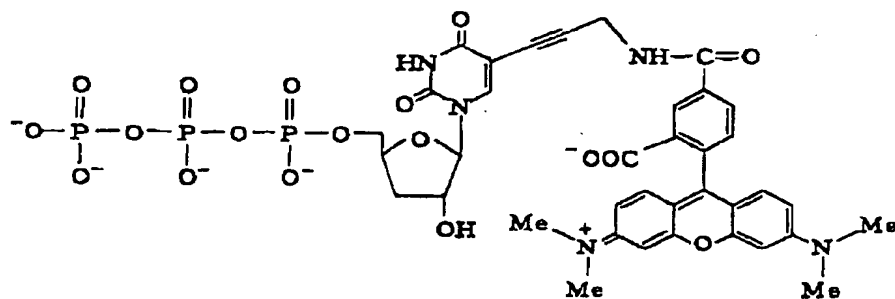
上記 5-カルボキシ-X-ローダミン標識 3'-デオキシシチジン-5'-トリフォスフェートは、実施例 4 で使用したものと同一の化合物である。また、5-カルボキシローダミン 6G 標識 3'-デオキシアデノン-5'-トリフォスフェート, 5-カルボキシローダミン 110 標識 3'-デオキシグアノシン-5'-トリフォスフェート, 及び 5-カルボキシテトラメチルローダミン標識 3'-デオキシウリジン-5'-トリフォスフェートは以下の化学式で示される化合物である。



5-カルボキシローダミン 6G 標識 3'-デオキシアデノン-5'-トリフォスフェート



5-カルボキシローダミン 110 標識 3'-デオキシグアノシン-5'-トリフォスフェート



5-カルボキシテトラメチルローダミン標識 3'-デオキシウリジン-5'-トリフォスフェート

乾燥させた反応物を株式会社パーキンエルマージャパンの ABI PRISM 377 DNA

Sequencing System 取り扱い説明書 Ver. 1.0 に従い、ホルムアミド/EDTA/Blue dextran loading buffer 6 μ l に溶解し、そのうち 2 μ l を、6M 尿素/4% ロングレンジャー™ アクリルアミド溶液 (FMC) を含むシーケンス解析用変性ゲルを用い、ABI 377 DNA Sequencer 及び解析プログラムにより解析した。その結果、図 16 に提示したが、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y あるいは L665P/F667Y は野生型 T7 RNA ポリメラーゼに比べて、ピーク強度が高く、更にバラツキが少なく、シーケンス読みとりが可能であることが判明した。ここで野生型 T7 RNA ポリメラーゼを用いた場合、ほとんどシーケンスは不可能であった。

実施例 6

変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P/F667Y を生産するための発現プラスミドの構築 (図面 17 参照)

変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P/F667Y の構築は、先に構築した変異型 T7 RNA ポリメラーゼ L665P/F667Y を生産する発現プラスミド構築方法 (実施例 2 参照) と同様に、PCR をベースにして以下のように行った。

変異型 T7 RNA ポリメラーゼ L665P/F667Y を生産する発現プラスミドを鋳型として、プライマー Xho-F とプライマー T7-DOUBLE-R (21mer: 5'-CTCTTTGGACCCGTAAGCCAG-3') の組み合わせとプライマー T7-DOUBLE-F (29mer: 5'-TTACGGGTCCAAAGAGTACGGCTTCCGTC-3') とプライマー Af111-R の組み合わせで各々 PCR を行った。この PCR 産物を直接鋳型として、DNA の塩基配列を決定し、プライマー T7-DOUBLE-R および T7-DOUBLE-F の配列を確認後、それぞれを 2% アガロース電気泳動を行い、目的の大きさの DNA フラグメントを精製した。この精製した 2 つの DNA を混合し、鋳型としてプライマー Xho-F および Af111-R 用いて PCR を行い、増幅した DNA フラグメントを制限酵素マッピング、DNA 塩基配列の解析

により目的のフラグメントであることを確認後、制限酵素 XhoI および AflIII を用いて酵素反応を行い、これを予め制限酵素 XhoI および AflIII で処理したプラスミド pT7RL665P/F667Y に T4 DNA ライゲースを用いて結合させた。この反応物を大腸菌 DH5 α に形質転換し、抗生物質アンピシリンを含んだ寒天平板上で生育するコロニーを複数得た。このコロニーをいくつか選択し、培養、プラスミド DNA の抽出を行い、目的の変異が導入されているかを DNA 塩基配列の決定を行い、確認し、最終的に目的の変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P/F667Y を生産するための発現プラスミド pT7RF644Y/L665P/F667Y を構築した (図 17 参照)。このプラスミドからの変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P/F667Y の生産は、野生型 T7 RNA ポリメラーゼの生産と同様、本プラスミドを含む大腸菌を培養し、IPTG を添加することにより発現誘導可能であった。

実施例 7

変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P/F667Y の精製

変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P/F667Y は、実施例 3 に記載の方法と同じ方法で精製可能であった。典型的な例として、1 リッターの培養液から 1,000,000 単位の変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P/F667Y 蛋白質が精製された。得られた RNA ポリメラーゼは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて、ほぼ単一バンドであり、この標品から RNase は検出されなかった。

実施例 8

3' dNTP 誘導体の取り込み率の改善

実施例 7 で精製した変異型 T7 RNA ポリメラーゼのリボヌクレオチド (NTP) と 3' デオキシヌクレオチド (3' dNTP) の取り込み率を以下のように測定した。

転写反応の鋳型は、プラスミド pBluescript (KS+) (ストラタジーン社) を制

限酵素、PvuII で反応し、線状としたものを用い、ATP, CTP, GTP, UTP をそれぞれ 250 μ M、2mM spermidine-(HCl)3、5mM DTT、40mM Tris/HCl pH 8.0、0.1 \square l の[alpha-32P]UTP (3000 Ci/mmol) の条件下、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P/F667Y を 25 単位、反応に用いた。そして、2種類の反応液 (3' dATP の無添加又は添加 (終濃度 100 μ M)) を用意して、37°C、60 分反応させた。そして、この反応物全量を DE81 paper (ワットマン社) にスポットし、リン酸緩衝液で 3 回洗浄、乾燥させ、DE81 paper をシンチレーションバイアルに入れて、シンチレーションカウンター (ベックマン) を用いて、それぞれの放射活性を測定した。これにより得られた放射活性より、3'-dATP の添加、無添加時の値と比較することによってどれだけ[alpha-32P]UTP の取り込みが阻害されるかを算出した。算出値を、野性型 T7 RNA ポリメラーゼの阻害度 1.000 と比較して得られる相対活性を表 1 に示す。

上記 F644Y/L665P/F667Y 変異体に代えて、野性型 T7 RNA ポリメラーゼ、実施例 3 で得た変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y 若しくは L665P/F667Y、又は実施例 2 及び 3 と同様の方法で構築精製した変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P、F782Y、F733Y、F646Y 若しくは Y639F を反応に用いて、阻害結果を得た。相対活性を表 1 に示す。

表 1 の結果は、数値が大きいほど、その変異型酵素が、3'-dATP を取り込みやすくなっている変異であることを示している。例えば、この場合、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P/F667Y は、野性型酵素より、5.58 倍、3'-dATP を取り込みやすい酵素であることを意味する。F644Y/L665P/F667Y 変異体は、今回、作製した変異型酵素の中で、もっとも 3'-dNTP を取り込むバイアスの少ない変異型酵素であることを示している。

表 1

変異部位	3' dATPによるRNポリメラーゼの相対活性
F644Y	5. 130
F644Y/L665P	5. 130
L665P/F667Y	4. 711
F644Y/L665P/F667Y	5. 580
F782Y	1. 173
F733Y	1. 075
F646Y	0. 459
Y639F	0. 930
野生型	1. 000

実施例 9

変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P/F667Y を用いたシーケンス反応例

シーケンス反応の鋳型として用いた鋳型は以下のようにPCRにより作製した。

PCR の鋳型として human thyroid-stimulating hormone (hTSH- β) cDNA を T7 プロモーターを有する BS750 由来のプラスミドにサブクローニングしたものを用いた。この hTSH- β をもつプラスミド、100fg を用い、クローニング部位を挟む形で存在する L220 プライマー (5'-TAA CAA TTT CAC ACA GGA AAC A-3') 及び 1211 プライマー (5'-ACG TTG TAA AAC GACGGC CAG T-3') で反応液量 20 μ l で PCR [(94°C 2 分) 1 回、(94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 1.5 分) 30 回、72°C 5 分] を行った。この PCR で出来た PCR 産物の 1211 プライマーの下流に T7 プロモーターが存在する。

シーケンス転写反応は、Melton, D. A [Nucleic Acids Res., 12:7035-7036 (1984)] に示されている方法を用いて行った。

上記 PCR 産物の内 1 μ l (約 10ng) をシーケンス反応に用いた。反応は、3' dNTP

の誘導体として、実施例 5 で用いたと同様のダイ・ターミネーター 4 μ M MR6G-3' dATP [5-カルボキシローダミン 6G 標識 3'-デオキシアデノシン-5-トリフォスフェート (n=4)]、4 μ M R110-3' dGTP [5-カルボキシローダミン 110 標識 3'-デオキシグアノシン-5-トリフォスフェート (n=4)]、80 μ M XR-3' dCTP [5-カルボキシ-X-ローダミン標識 3'-デオキシシチジン-5-トリフォスフェート (n=4)]、20 μ M TMR-3' dUTP [5-カルボキシテトラメチルローダミン標識 3'-デオキシウリジン-5-トリフォスフェート (n=4)]を用いた。さらに 500 μ M UTP、250 μ M ATP、200 μ M CTP、500 μ M GTP、2mM スペルミジン-(HCl)3、5mM DTT、40mM Tris/HCl pH8.0 (BRL、ギブコ社)の条件下、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y/L665P/F667Y 25 単位を加えて、合計反応体積 10 μ l として、37°Cで一時間反応を行った。

次に反応産物中に残存している未反応のダイ・ターミネーターを除去するため、セファデックス G-50 カラム(ファルマシア・バイオテック製)を用いたゲル濾過法により転写産物を精製し、精製産物は遠心式エバポレーターを用いて蒸発乾固した。

この乾燥させた反応物を株式会社パーケンエルマー・ジャパンの ABI PRISM 377 DNA sequencing System 取り扱い説明書 Ver. 1.0 に従い、ホルムアミド/EDTA/Blue dextran loading buffer 6 μ l に溶解し、そのうちの 2 μ l を、6M 尿素/4% ロングレンジャーTM アクリルアミド溶液(FMC 社)を含むシーケンス解析用変性ゲルを用い、ABI 377 DNA sequencer 及び解析プログラム(Sequencing Analysis Ver. 3.0)により解析し、エレクトロフェログラムを得た。図 18 にその結果を示す。このように良好なシーケンス解析が可能である。

請求の範囲

- (1) 対応する野性型RNAポリメラーゼの能力と比較して、3' デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体を取り込む能力を増加させるように、少なくとも1つのアミノ酸が修飾された野性型RNAポリメラーゼからなることを特徴とするRNAポリメラーゼ。
- (2) 野性型RNAポリメラーゼのヌクレオチド結合部位中に存在する少なくとも1つのアミノ酸が修飾されている請求項1記載のRNAポリメラーゼ。
- (3) アミノ酸の修飾が、アミノ酸の置換、挿入または欠落である請求項2に記載のRNAポリメラーゼ。
- (4) 野性型RNAポリメラーゼのヌクレオチド結合部位中に存在する少なくとも1つのアミノ酸がチロシンに置換されている請求項1～3のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼ。
- (5) 置換されるアミノ酸がフェニルアラニンである請求項4に記載のRNAポリメラーゼ。
- (6) ヌクレオチド結合部位に存在するアミノ酸が、ヘリックス Y とヘリックス Z との間のループ中のアミノ酸及び／又はヘリックス Z とヘリックス AA との間のループ中のアミノ酸である請求項2～5のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼ。
- (7) 3' デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体に対する取り込み能力を、野性型の少なくとも2倍増加させるように修飾されている請求項1～6のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼ。
- (8) T7ファージ、T3ファージ、SP6ファージ、K11ファージに由来する請求項1～7のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼ。

(9) T7ファージ由来のRNAポリメラーゼのアミノ酸残基641-667に対応する領域から選択される領域中の少なくとも1つのアミノ酸が修飾されている野性型RNAポリメラーゼであることを特徴とするRNAポリメラーゼ。

(10) 修飾されるべき野性型RNAポリメラーゼが、前記以外のアミノ酸の置換、挿入または欠落を、さらに有する請求項1～9のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼ。

(11) T7ファージ由来のRNAポリメラーゼであって、アミノ酸残基644または667においてチロシンを有するRNAポリメラーゼ。

(12) T7ファージ由来のRNAポリメラーゼがアミノ酸残基644及び667以外のアミノ酸の置換、挿入または欠落をさらに有する請求項11に記載のRNAポリメラーゼ。

(13) 野性型T7RNAポリメラーゼの644番目のアミノ酸残基フェニルアラニンがチロシンに置換されたことを特徴とするRNAポリメラーゼ。

(14) 野性型T7RNAポリメラーゼの667番目のアミノ酸残基フェニルアラニンがチロシンに置換されたことを特徴とするRNAポリメラーゼ。

(15) 野性型T7RNAポリメラーゼの665番目のアミノ酸残基ロイシンがプロリンに置換されている請求項13又は14に記載のRNAポリメラーゼ。

(16) 野性型T7RNAポリメラーゼの644番目のアミノ酸残基フェニルアラニンがチロシンに置換され、かつ667番目のアミノ酸残基フェニルアラニンがチロシンに置換されていることを特徴とするRNAポリメラーゼ。

(17) 野性型T7RNAポリメラーゼの665番目のアミノ酸残基ロイシンがプロリンに置換されている請求項16に記載のRNAポリメラーゼ。

(18) T3ファージ由来のRNAポリメラーゼであって、アミノ酸残基645

または668においてチロシンを有するRNAポリメラーゼ。

(19) T3ファージ由来のRNAポリメラーゼがアミノ酸残基645及び668以外のアミノ酸の置換、挿入または欠落をさらに有する請求項18に記載のRNAポリメラーゼ。

(20) K11ファージ由来のRNAポリメラーゼであって、アミノ酸残基664～669の間または690においてチロシンを有するRNAポリメラーゼ。

(21) K11ファージ由来のRNAポリメラーゼがアミノ酸残基664～669の間または690以外のアミノ酸の置換、挿入または欠落をさらに有する請求項20に記載のRNAポリメラーゼ。

(22) SP6ファージ由来のRNAポリメラーゼであって、アミノ酸残基633～638の間または670においてチロシンを有するRNAポリメラーゼ。

(23) SP6ファージ由来のRNAポリメラーゼがアミノ酸残基633～638の間または670以外のアミノ酸の置換、挿入または欠落をさらに有する請求項22に記載のRNAポリメラーゼ。

(24) 請求項1～18のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド。

(25) 請求項1～24のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼを製造する方法であって、

RNAポリメラーゼをコードする核酸分子を用意し、

ヌクレオチド塩基配列内の1つまたはそれ以上の部位における1つまたはそれ以上の塩基を変更させるように該核酸分子に突然変異を起こさせ、次いで

変異させた核酸分子により発現される修飾されたRNAポリメラーゼを回収することを含む方法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

 1

AGGCACATAAATGACATCGCTAAGAACGACTTCTCTGACATCGAACTGGCTGCTATCCCCGTTCAACACT:3239
 M N T I N I A K N D F S D I E L A A I P F N T :23
 CTGGCTGACCATACGGTGAGCGTTTAGCTCGGAACAGTTGGCCCTTGAGCATGAGTCTTACGAGATGGGTGAAGCA:3317
 L A D H Y G E R L A R E Q L A L E H E S Y E M G E A :49
 CGCTTCCGCAAGATGTTGAGCGTCAACTTAAAGCTGGTGAGGTTCGGGATAACGCTGCCGCCAAGCCTCTCATCACT:3395
 R F R K M F E R Q L K A G E V A D N A A A K P L I T :75
 ACCCTACTCCCTAAGATGATGACGATCAACGACTGGTTGAGGAAGTAAAGCTAAGCGGCAAGCGCCCGACA:3473
 T L L P K M I A R I N D W F E E V K A K R G K R P T :101
 GCCTTCCAGTTCTGCAAGAAATCAAGCCGGAAGCCGTAGCTACATCACCATTAAGACCACTCTGGCTTGCCCTAACCC:3551
 A F Q F L Q E I K P E A V A Y I T I K T T L A C L T :127
 AGTGTGACAATAACAACCGTTTCAGGCTGTAGCAAGCGCAATCGGTGGGCCATTGAGGACGAGGCTCGCTTCGGTCGT:3629
 S A D N T T V Q A V A S A I G R A I E D E A R F G R :153
 ATCCGTGACCTTGAAGCTAAGCACTTCAAGAAAAACGTTGAGGAACAACCTCAACAAGCGGTAGGGCACGCTCTACAAG:3707
 I R D L E A K H F K K N V E E Q L N K R V G H V Y K :179
 AAAGCATTTATGCAAGTTGTGAGGCTGACATGCTCTCTAAGGCTCTACTCGGTGGCGAGGCGGTGCTTCTCGTGGCAT:3785
 K A F M Q V V E A D M L S K G L L G G E A W S S W H :205
 AAGGAAGACTCTATTATGATGAGGATGCTGCTGATCGAGATGCTCATTTGAGTCAACCGGAATGGTTAGCTTACACCGC:3863
 K E D S I H V G V R C I E M L I E S T G M V S L H R :231
 CAAAATGCTGGCTAGTAGGTCAGACTCTGAGACTATCGAATCGACCTGAATACGCTGAGGCTATCGCAACCCGT:3941
 Q N A G V V G Q D S E T I E L A P E Y A E A I A T R :257
 GCAGGTGGCTGGCATCTCTCCGATGTCTCCAACTTGGCTAGTTCTCTCTAAGCCGTGGACTGGCATTACTGGT:4019
 A G A L A G I S P M F Q P C V V P P K P W T G I T G :283
 GGTGGCTATTGGGCTAACGGTCTGCTCCTCTGGCGCTGGTGCTACTCACAGTAAAGAACCACTGATGCGCTACGAA:4097
 G G Y W A N G R R P L A L V R T H S K K A L M R Y E :309
 GACGTTTACATGCCCTGAGGTGTACAAAGCGATTAAACATTGCGCAAAACACCGCATGGAAATCAACAAGAAAGTCTTA:4175
 D V Y M P E V Y K A I N I A Q N T A W K I N K K V L :335
 GCGGTGCCCAACGTAATCACCAGTGGAAGCATTTGTCGGTTCGAGGACATCCCTGCGGATTGAGCGTGAAGAACTCCCG:4253
 A V A N V I T K W K H C P V E D I P A I E R E E L P :361
 ATGAAACCGGAAGACATCGACATGAATCCTGAGGCTCTCACCGCGTGGAAACGTCGCTGCTGTGTACCCGCAAG:4331
 M K P E D I D M N P E A L T A W K R A A A A V Y R K :387
 GACAAGGCTCGCAAGTCTCGCCGTATCAGCCTTGAGTTTCATGCTTGAGCAAGCCCAATAAGTTTGCTAACCCATAAGCC:4409
 D K A R K S R R I S L E F M L E Q A N K F A N H K A :413
 ATCTGGTTCCTTACAACATGGACTGGCGCGGTCTGTTTACGCTGTGTCAATGTTCAACCCCGCAAGTAACGATATG:4487
 I W F P Y N M D W R G R V Y A V S M F N P Q G N D M :439
 ACCAAAGGACTGCTTACGCTGGCGGAAGGTAAACCAATCGGTGAAGGTTACTACTGGTGAATAATCCACGGTGCA:4565
 T K G L L T L A K G K P I G K E G Y Y W L K I H G A :465

THIS PAGE BLANK (USPTO)

☒ 2

AACTGTGCGGTGTCGATAAGGTTCCGTTCCCTGAGCGCATCAAGTTTCATTGAGGAAAACCCAGGAACATCATGGCT:4643
 N C A G V D K V P F P E R I K F I E E N H E N I M A :491
 TGGGCTAAGTCTCCACTGGAGAACACTTGGTGGCTGAGCAAGATTCTCCGTTCTGCTTCCGTTCTGCTTTGAG:4721
 C A K S P L E N T W W A E Q D S P F C F L A F C F E :517
 TACGCTGGGTACAGCACCACCGCTGAGCTATAACTGCTCCCTTCCGCTGGCGTTTGACGGTCTTGTCTTGGCATC:4799
 Y A G V Q H H G L S Y N C S L P L A F D G S C S G I :543
 CAGCACTTCTCCGGATGCTCCGAGATGAGGTAGGTGGTCGGCGGTTAACTTGTCTTCCCTAGTGAACCGTTTCAGGAC:4877
 Q H F S A M L R D E V G G R A V N L L P S E T V Q D :569
 ATCTACGGGATTGTTGCTAAGAAAGTCAACGAGATTCTACAAGCAGACGCAATCAATGGACCGGATAACGAAGTAGTT:4955
 I Y G I V A K K V N E I L Q A D A I N G T D N E V V :595
 ACCGTGACCGATGAGAACACTGGTGAATCTCTGAGAAAAGTCAAGCTGGGCACTAAGGCACTGGTGGTCAATGGCTG:5033
 T V T D E N T G E I S E K V K L G T K A L A G Q W L :621
 GCTTACGGTGTACTCGCAGTGTGACTAAGCGTTTCAGTCAATGACGCTGGCTTACGGGTCCAAAGAGTTTCGGCTTCCGT:5111
 A Y G V T R S V T K R S V M T L A Y G S K E F G F R :647
 CAACAAGTGTGAAGATACCATTCAGCCAGCTATTGATTCGGCAAGGTTCTGATGTTCACTCAGCCGCAATCAGGCT:5189
 Q Q V L E D T I Q P A I D S G K G L M F T Q P N Q A :673
 GCTGGATACATGGCTAAGCTGATTGGGAATCTGTGAGCGTGTGAGCTGGGTGAGTGAAGCAATGAATGGCTT:5267
 A G Y M A K L I W E S V S V T V V A A V E A M N W L :699
 AAGTCTGCTGAAGCTGCTGGCTGCTGAGGTCAAGATAAGAAAGTGGAGAGATTCTTCGCAAGCGTTGCGCTGTG:5345
 K S A A K L L A A E V K D K K T G E I L R K R C A V :725
 CATTGGGTAACTCCTGATGGTTTCCCTGTGTGGCAGGAATACAAGAGCCTATTTCAGACGCGCTTGAACCTGATGTT:5423
 H W V T P D G F P V W Q E Y K K P I Q T R L N L M F :751
 CTCGGTCAGTTCCGCTTACAGCCTACCAATTAACACCAACAAAGATAGCGAGATTGATGCACACAAACAGGAGTCTGGT:5501
 L G Q F R L Q P T I N T N K D S E I D A H K Q E S G :777
 ATCGCTCCCTAACTTTGTACACAGCCAGCGGTAGCCACCTTCGTAAAGACTGTAGTGTGGGCACACGAGAAGTACGGA:5579
 I A P N F V H S Q D G S H L R K T V V W A H E K Y G :803
 ATCGAATCTTTTGCACCTGATTACGACTCCTTCGGTACCATTCCGGCTGACGCTGGCAACCTGTTCAAAGCAGTGGC:5657
 I E S F A L I H D S F G T I P A D A A N L F K A V R :829
 GAAACTATGGTTGACACATATGAGTCTTGTGATGTAATGCTGCTGATTTCTACGACCAAGTTCGCTGACCAAGTTCACGAG:5735
 E T M V D T Y E S C D V L A D F Y D Q F A D Q L H E :855
 TCTCAATTGGACAAAATGCCAGCAGCTTCCGGCTAAAGGTAAGTGAACCTCCGTTGACATCTTAGAGTCGGACTTCGCG:5813
 S Q L D K M P A L P A K G N L N L R D I L E S D F A :881
 TTCGCGT:5820
 F A :883

THIS PAGE BLANK (USPTO)


```

T7 1:MNTI-NIAKNDFSIEDIAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITT
T3 1:..I.E.E.....E.....SA.K.....L.R.L..L..A.....I.....LA.
K11 1:..AL-.GR...E.....Y.I.SE...DOA.....A..L.RQ..L..L..V...F.....VL.
SP6 1:-----MQLH.I-.Q..E.MFNG.IR..EADQQ..IA..SES.T.WNRR.LSE
      * * * * * * * * * * * * * * * *

```

T7 80:KMIARINDWFEVKAKRGKRPFAQFL-QEIKPE-A---VAYI-TIK-----TTLA---CLTSADNT-TVQ--A
 T3 81:LT'T..VE.L..YAS.K.RK.S.YAP-.LL.....-S.F--L-----VI-----S..TNM--.I....
 K11 80:QLTK..D..K..QANA..K.R.YYPIKHGVAS.L.VSMG.EVLKE.RGVSSAIAL.TIKVV.GN.HRPLKGHP.
 SP6 52:P.AEG.QAYK..YEG.K.RA.R.LA..Q-CVEN--VA---.YI.M.--V---V-M--DM--NT.A.L---Q-.*

140: AIGRAI EDEARFGRIRDLEAKHFKKNV EEQLNKR VGHVYKKA FMQVVEADMLSKGLLG- EAWSSWHKEDSIHVGVR
 141: ML.K.....H.....H.Q.....IGR.....-.....D..T.TM...I.
 160: QL.K.L.....EQ..AY....AD..D.....I...M...-DN.A..KTDEQM...TK
 110: SVAER...QV..SKLEGHA..Y.E.-.KKS.KASRTKS.RH.HNVA.V.EKSVAEKDADFDR.EA.P..TQLQI..TT

219:MLIESTGMVSLHRON-A-GVVVG-QDSEITIELAPEYAEAIATR-AGALAGISPMFQPCVVPPKWTGITGGYW-ANG
220:.....L.E.Q.H.--NA-S.H.ALQ..Q.VDVL.K.-.....VA.....-.....
239:L..G..L.EMTKNM.D.SDDVTSMQMVQ..AFV.LLSK.-.....H.....VETV....-SV.
189:I.-.GSVFYNGEPPVFMRAMRTYGGKTIYYLQTS.SVGQWISAFKEHV.QL.AYA...I..R..RTPFN..FHTKRV
* * * * *

T7 294:LALVRTHSKKALMRVEDVYMPVEVKAINIAQNTAWNKVKVLAVANVTWK-KCPVED-IPAIEREELP--MKPED
T3 295:.....G.....V.L.....V.E.VN.-N..A.--SL.Q....-P.D.
K11 317:.....R.A.H.....V.L...P.V.....V.E.VN.--G-V.....-PR.D.
SP6 268:IR.KGN-REHVRKLTKQ.K.....AL..Q.Q..D....IEEVIRLDLGYG.PSFK.L.DK.NK.ANPV.VE

** ** * * * * *

```

IT7 367: I---D-MNPEALTAW---KRAA--AAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIFPNMMDWRGRVY-AVSMF
IT3 368: ---T.EA.KE.-----K.---GI..L...V.....SK.....P..
IK11 390: ---T.EV.RK.-----RKE.---Q...CRC...VA.....-.....
SP6 347: LRGRLEKEMLSPEQ.QQFINWKGECLRL.TAETK.G.KSAAVVR.VG..R.YSAFES.Y.V.A..S.S...VQS.TL

```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

T7
T3
K11
SP6

436:GNDMTKGLLTLAKGKPI-GKEGYWLKIHGANCAGVDKVFPFPERI-KFTIENHENI-MACAKSPLENTWAAEQDSPF
437:.....-E.F.....-A..KHVDD.-L....D.IN.....
459:.....S.....LD.F.....EG.-L.S.AD.N...TO...
427:S..LG.A..RFTE.R.VN.V.ALK.FC.N...LW.W..KT.DV.VSNULD.EFQDMCRDI.AD.TF.Q.KA.A.Y
** * * * * ** * * *

```

513:AFCEYA---GVQHHG-L-SYNCSLPLAFDSCSGIQHFSAMLRLDEVGGRVAVNLLPSETVQDIYIGIVAKKVNELQ
T7
514:-----T-----Q.....KQ
K11
536:-----K-----N-----SI-----D-----K-----D-----V-HQ
SP6
507:W.....QYLDLVE-RADEFTH.VHQ.....Y.....AK...K.DAP...A...Q---V-I
* **** * ** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** **

```

588:NGTDNEUVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQ-PAIDSGK
T7
T3
K11
SP6
589:..P.MI...L...ST..Q.....D.....
611:..SQTVEQIAKE..FH..T.ESV.A..Q..K.....SLV.....N.E
581:..ALYMDADDA.TFTS.SVTLSGT-ELR.M.SA.DSI.I..L.KP...P...TRLTC.ES.IDYIVDLEEKAAQ..

T7 667:FT-QPNQAAGYMAKLIWESVSVTVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEILR---KRC-AVHVVTDPDGFVPVQWE
T3 668:---DA.....K.....H---T.....
K11 690:-H.....DA.T.....K.V.....I.....
SP6 660:EGRTA.KVHPFFEDDRQDYLTPGAAYNYMT.LI.PSISEVVK.PI.AM.MIROLA.FAA..NEGIMYTL.T..ILE.K

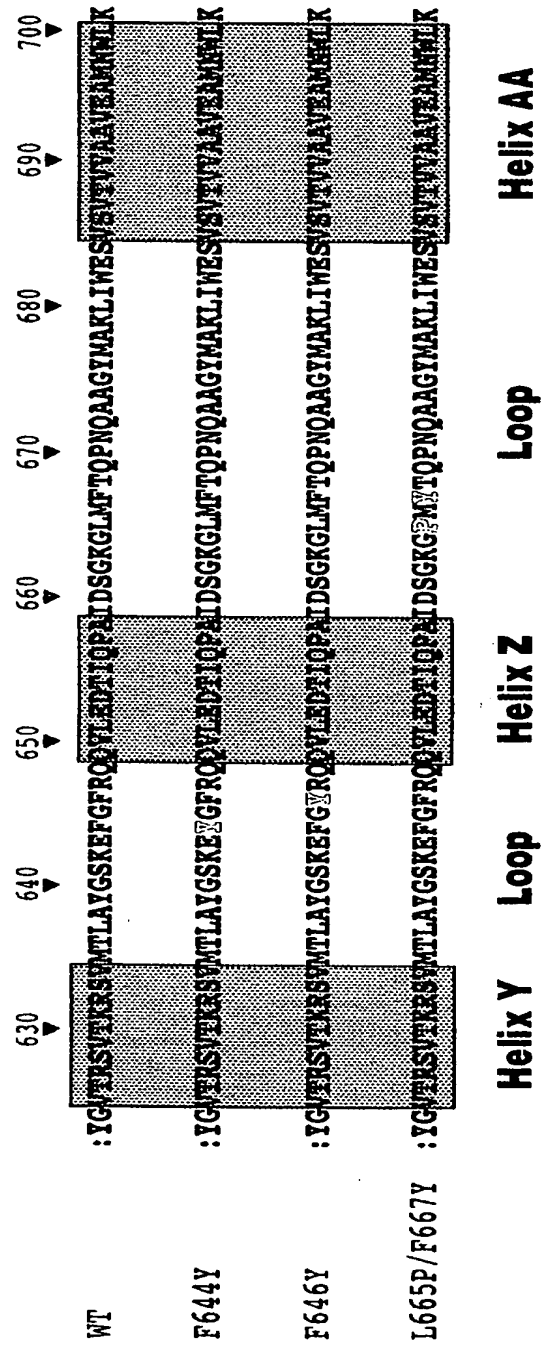
T7 742:PIQTRNLNMFQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSDGSHLRKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIP
T3 743:L.K.DMI.....L..G.....M..Y.....
K11 765:QN.A.K.V..ANVKM.Y.G.....M..H.N.V..D.....S..
SP6 740:TEML.VRTCLM.DIKMSLOVE.--IV.EAAMMGAA.....GH.A..IL..CELVD.--VT.I.V.....HA
* * * * *

822:ANLFKAVRETMVDYTESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRLDILESDFAFAT77
T3 823:GK.....I..NN.....S.....T.....P..K.....Q.....K.....
K11 845:G.....K..DN..I.....V.....D.....
SP6 816:LT.RV.LKGQ..AM.IDGNA.QKL-LE-EHEVR-WMV.TGIEV.EQ.EFD.NE.MD.EYV..**
* * * * *

图 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

```
T7RNaPol      1:MNTI-NIAKNFSDIELAAIPFNTLADHYGERLARQALAHESYEMGEARFKMFERQL
T3RNaPol      1:I.E.E.....E.....SA.K.....L.R.L..L...A
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

```

60:KAGEVADNAAAKPLITLLPKMIARINDWFEENVKAKRGKRPTAFQFLQEIKEAVAYITI
61:....I.....LA.....LTT..VE.L..YAS.K.RK.S.YAP..LL.....S.F..L
      **** **** **** **** **** * * * * * * * * * *

```

T77Rnapol 120: KTTLCLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDAEFRGRIRDLEAKHFKKNVEEQLNKRVGHVYK
 T37Rnapol 121: VI..S...TNM..I..A.GML.K.....H.....H.Q....

T7RNApol 180: KAFMQVVEADMLSKGLLGEAWSSWHKEDSIHVGVRCEIEMIESTGMVSLHRQNAAGVVGQ
T3RNApol 181:IGR.....D..TTM...I.L.....L.E.Q.H...N.A.S

*** **

```

T77RNaPol 240:DSEtIeLApEYAEAIATRaGALAGISPMFQPCVPPKPTGTGGYWGANGRRPLALVRT
T33RNaPol 241:H.ALQ..Q..VDVL.K.....VA.....

```

TT7RNaP01 300: HSKKALMR YEDVYMEVKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVTTKWKHCPVEDIPA IEREE
TT3RNaP01 301:G.....V.L.....V.E.VN..N...A...SL..Q.

TT7RNAP01 360: LPMKPEDIDMNP EALTAWKRAAAA VYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFFANHKAIWFFPN
 TT3RNAP01 361: ...P..D...T.EA..KE..K..GI..L...V.....SK.....

THIS PAGE BLANK (USPTO)

 7

```

T7RNaPol 420:MDWRGRVYAVSMFNPQNDMTKGLLTLAKGPIGEGYYWLKIHGANCAGVDKVPFPERI
T3RNaPol 421:.....P.....E..F.....
*****
T7RNaPol 480:KFIEENHENIMACAKSPLENTWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS
T3RNaPol 481:A...KHVDD.L...D.IN.....T.....
*** * **** * *****
T7RNaPol 540:CSGIOHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTD
T3RNaPol 541:.....L....ST..Q.....KQ.....P..MI....
*****
T7RNaPol 600:ENTGEISEKVKLGTKALAGOWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAI
T3RNaPol 601:KD.....L....ST..Q.....D.....
*****
T7RNaPol 660:DSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEIL
T3RNaPol 661:.....DA.....K....
*****
T7RNaPol 720:RKRCVHVWVTPDGFVPVWQYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIA
T3RNaPol 721:.H.....T.....R..L.K..DMI.....L..G.....
* *****
T7RNaPol 780:PNFVHSQDGSHLRKTVVWVAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESC
T3RNaPol 781:.....M...Y.....GK.....I...NN
*****
T7RNaPol 840:DVLADFYDQFADQLHESQDKMPALPAKGNLNRDILESDFafa
T3RNaPol 841:.....S.....T.....P..K.....Q..K....
*****

```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8

644 667

T7 617:AGQWLAYGVTRSVTRSRVMTLAYGSKHEFGFRQQVLEDTIQ-PAIDSGKGLMFT-OPNQAAAGYMAKLIWESVSVTV

T7 F644Y 617:AGQWLAYGVTRSVTRSRVMTLAYGSKHEFGFRQQVLEDTIQ-PAIDSGKGLMFT-OPNQAAAGYMAKLIWESVSVTV

T7 L665P/F667Y 617:AGQWLAYGVTRSVTRSRVMTLAYGSKHEFGFRQQVLEDTIQ-PAIDSGKGLMFT-OPNQAAAGYMAKLIWESVSVTV

T3 618:.Q.....D.....-.....DA.....

K11 640:.A...Q.....K.....SLV.....N.E.....-H.....DA.T....

SP6 609:.SA.DSI.I...L..KP.....P...TRLTC.ES.IDYIVDLEKEAQ.AVAEGRTA.KVHPEDDDRQDYLTGAA

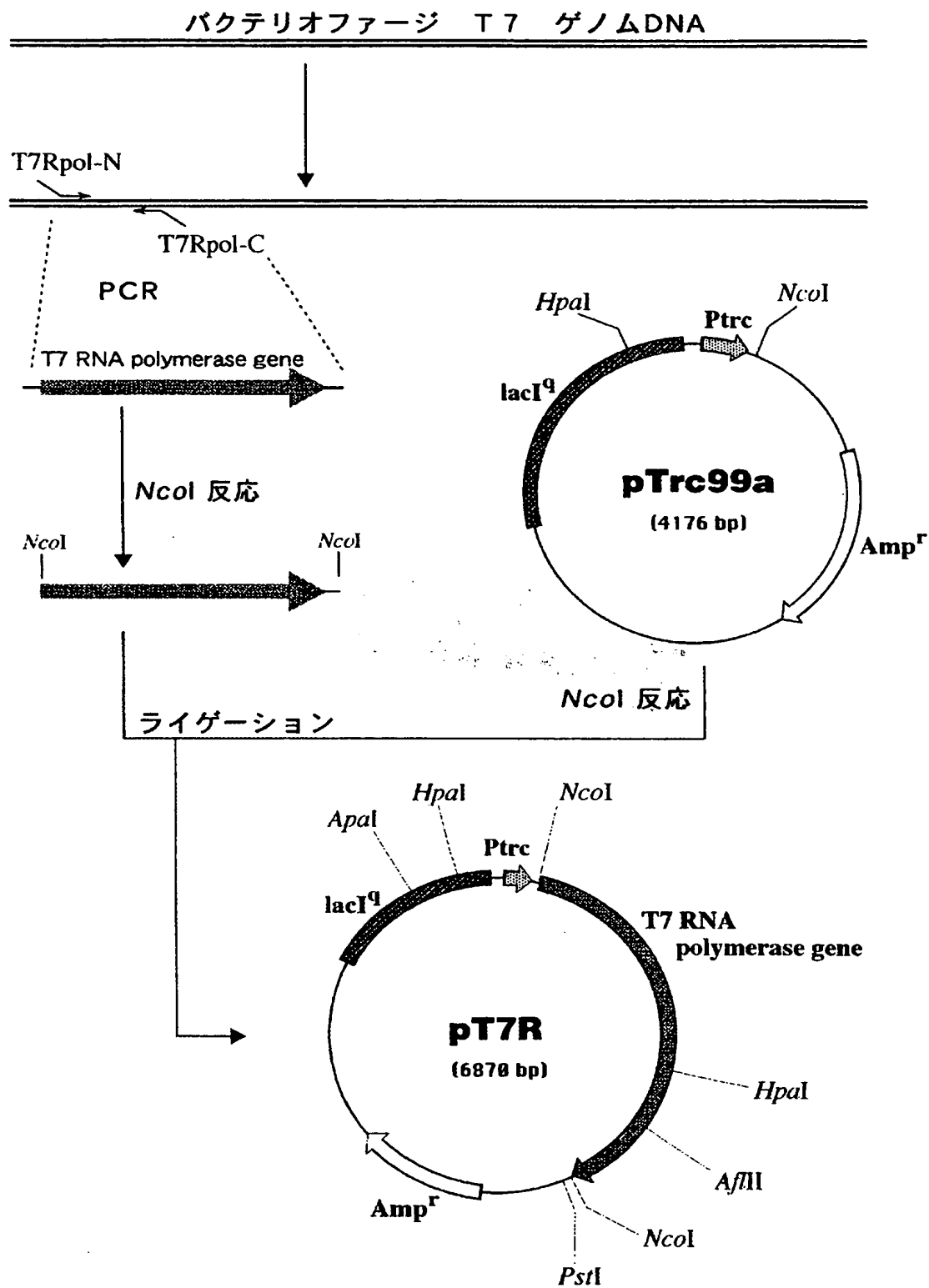
*

** **** *

Motif B

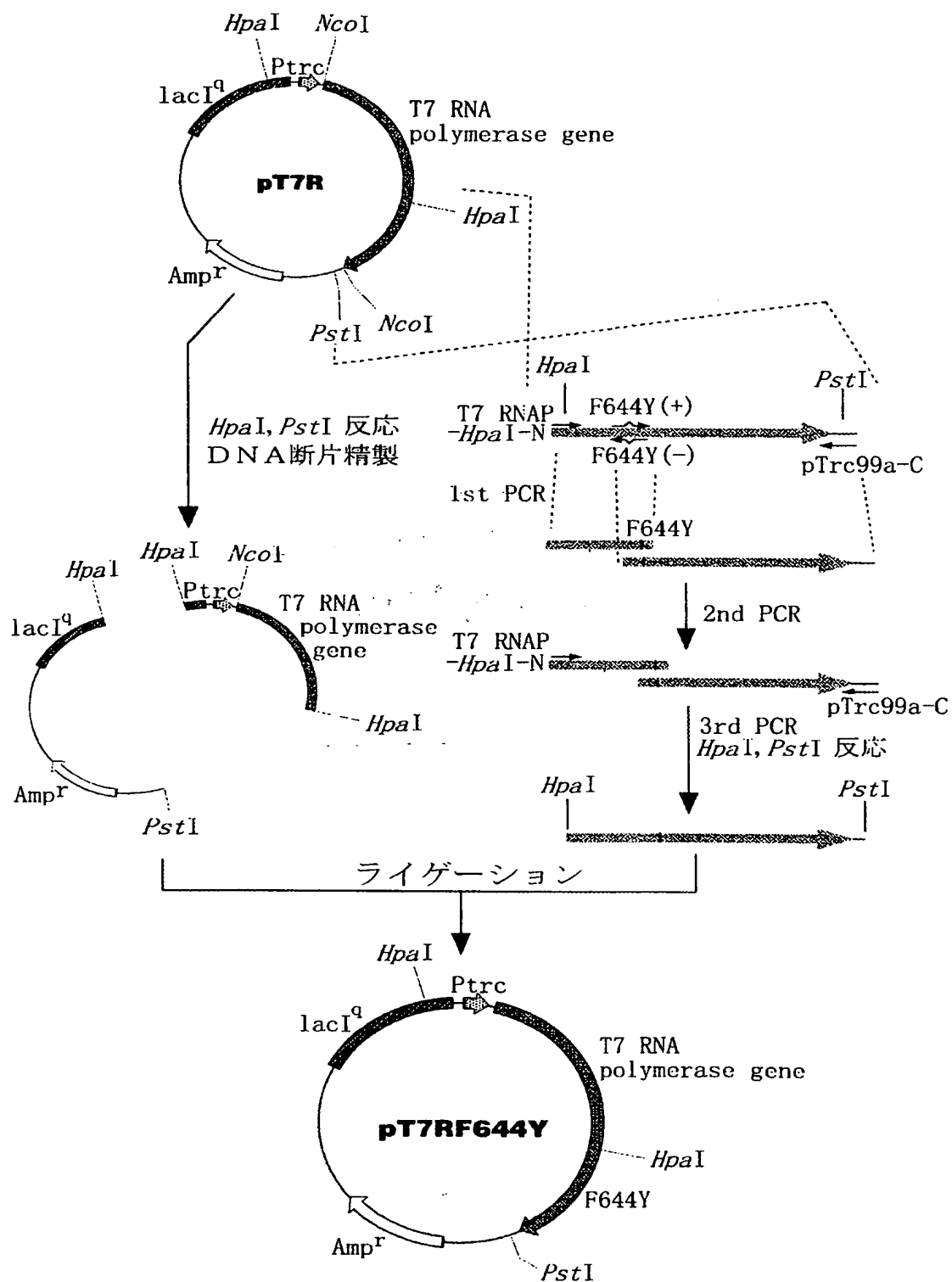
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 9



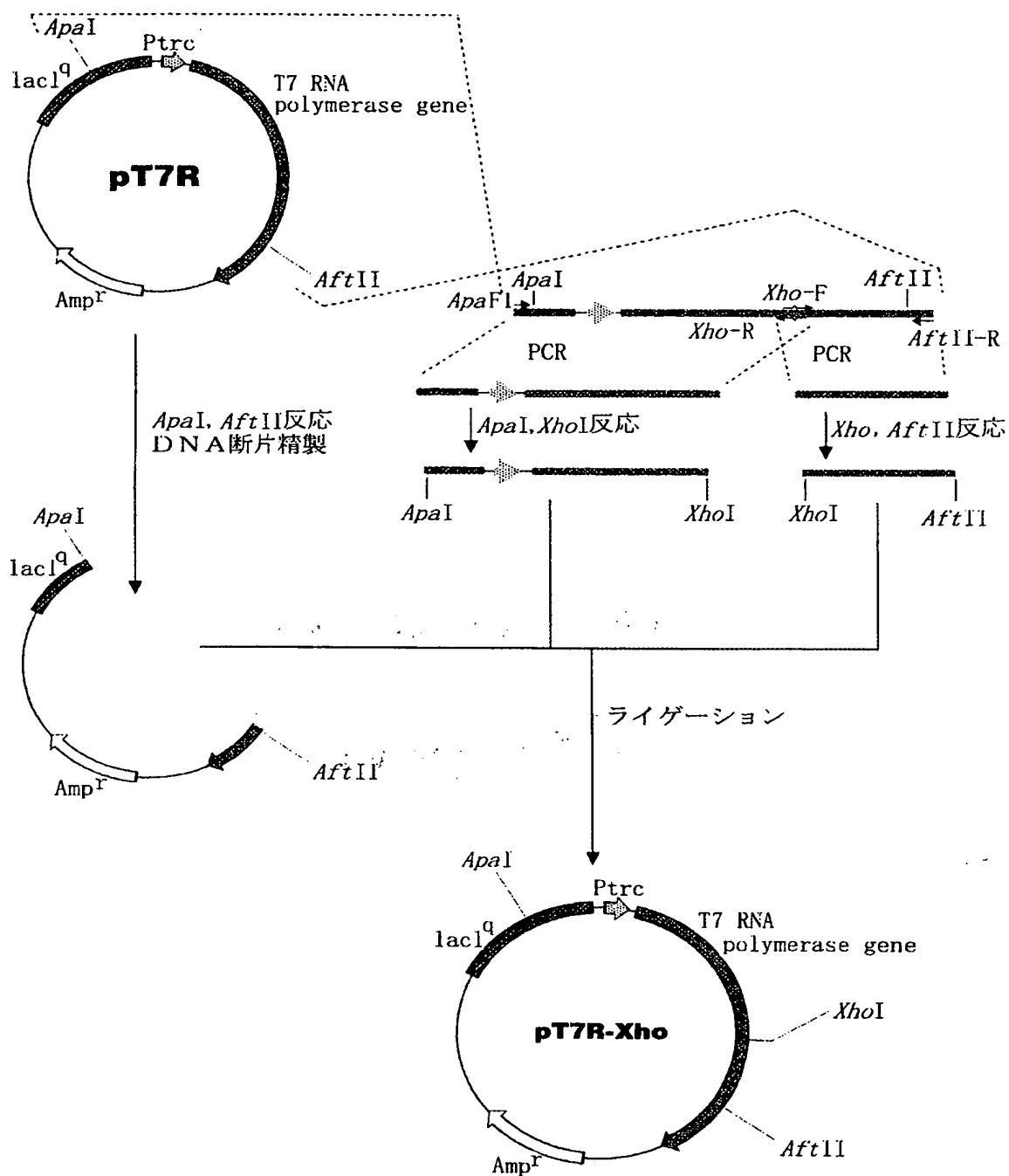
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 10



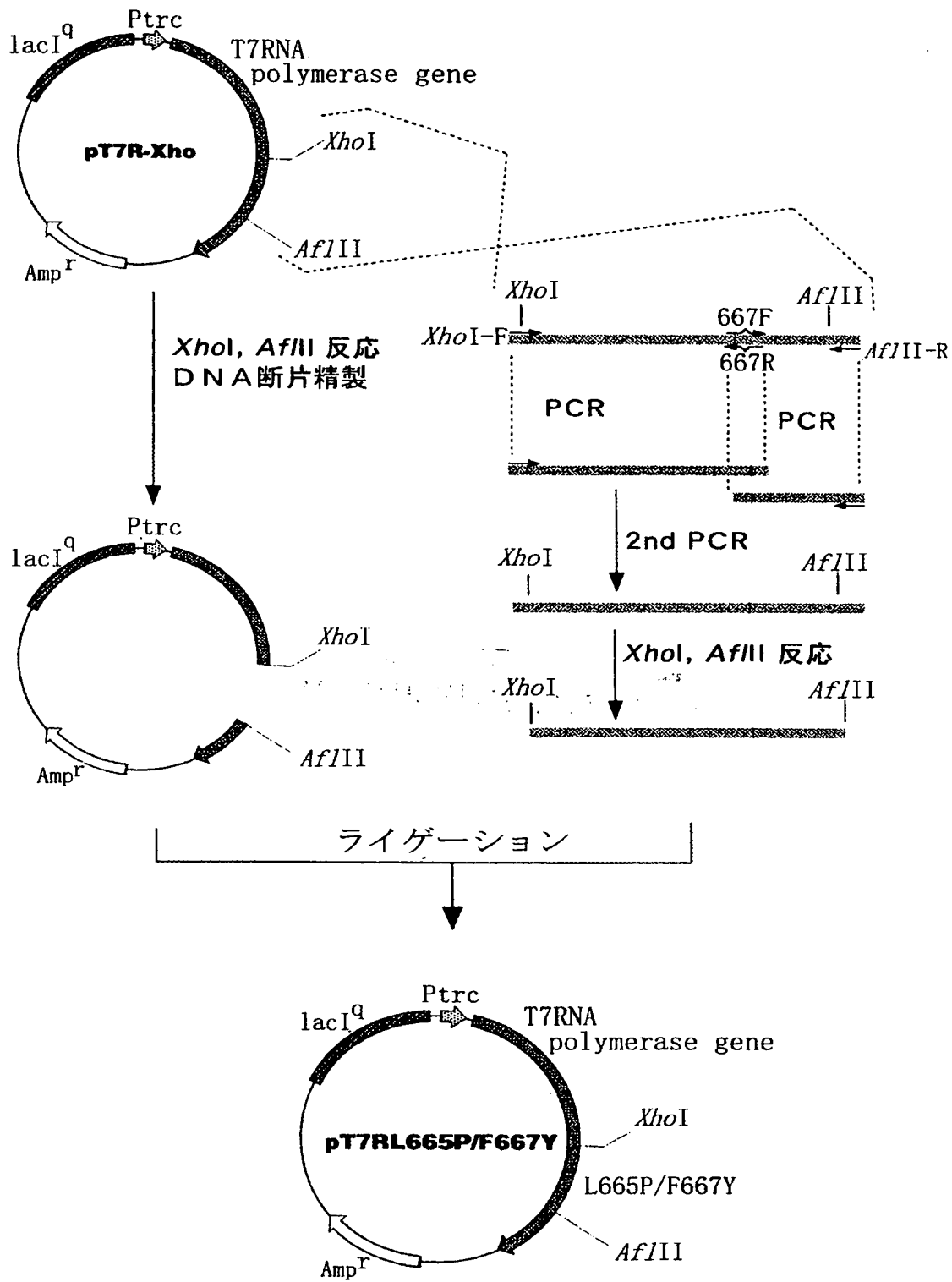
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 1 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

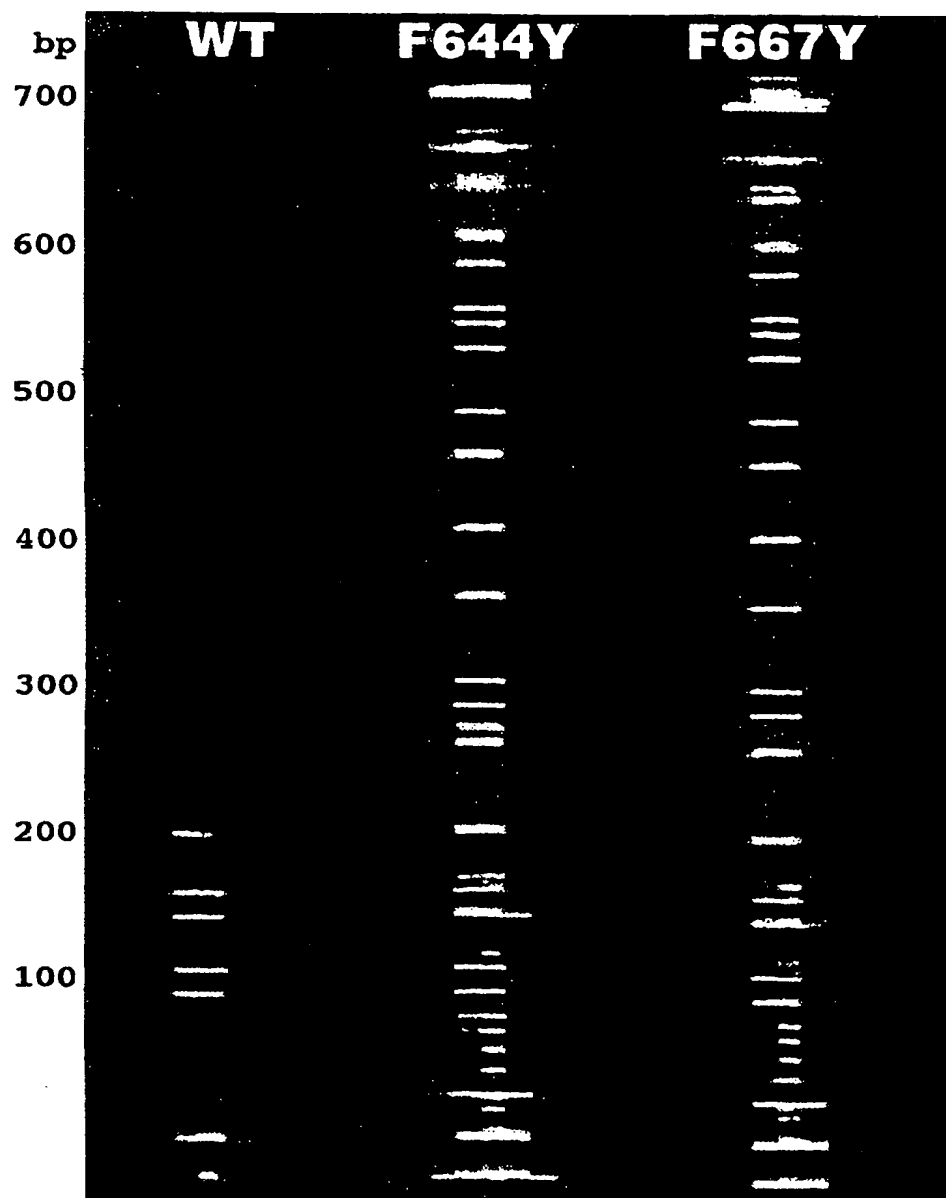
図 1 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

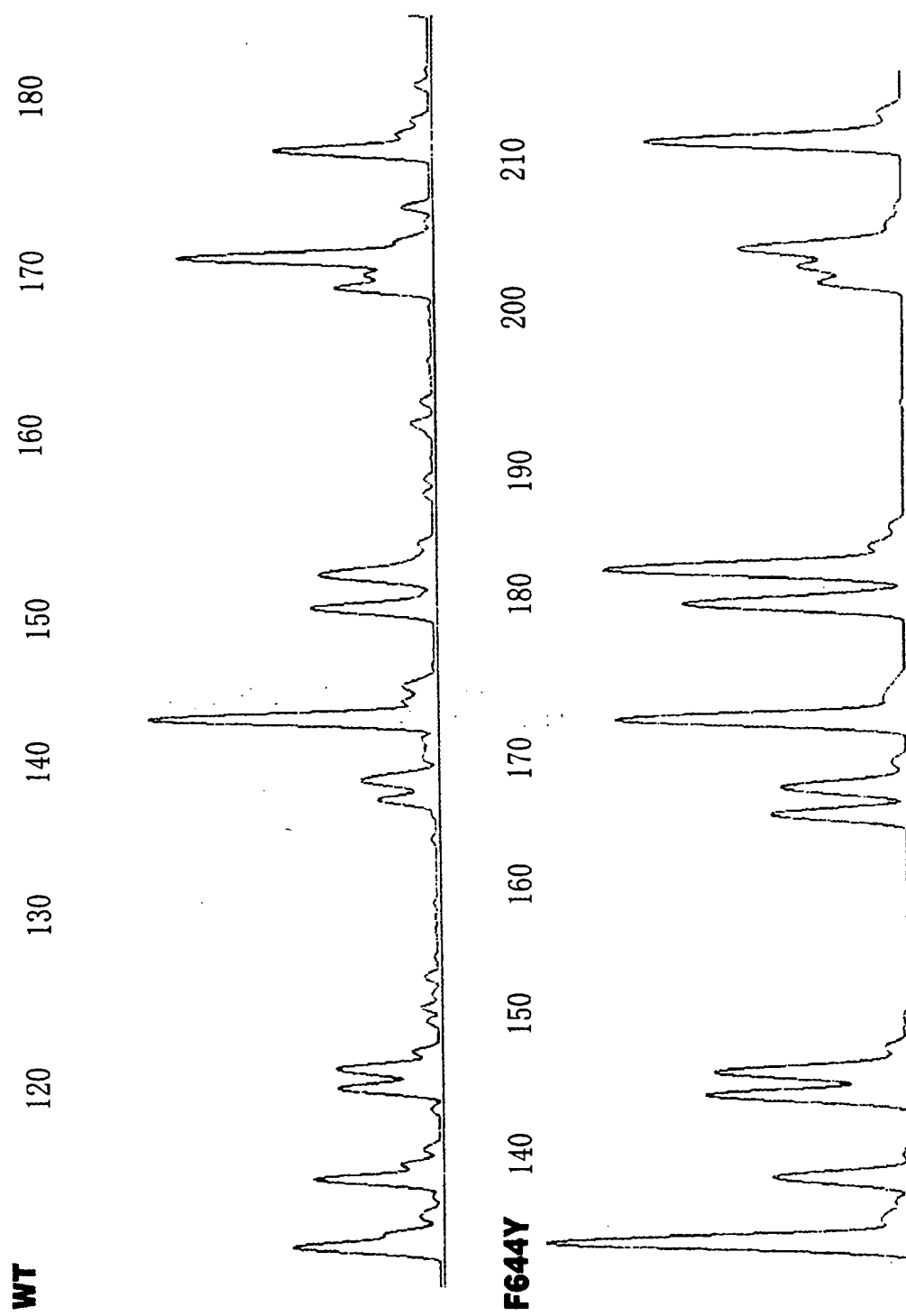
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 13



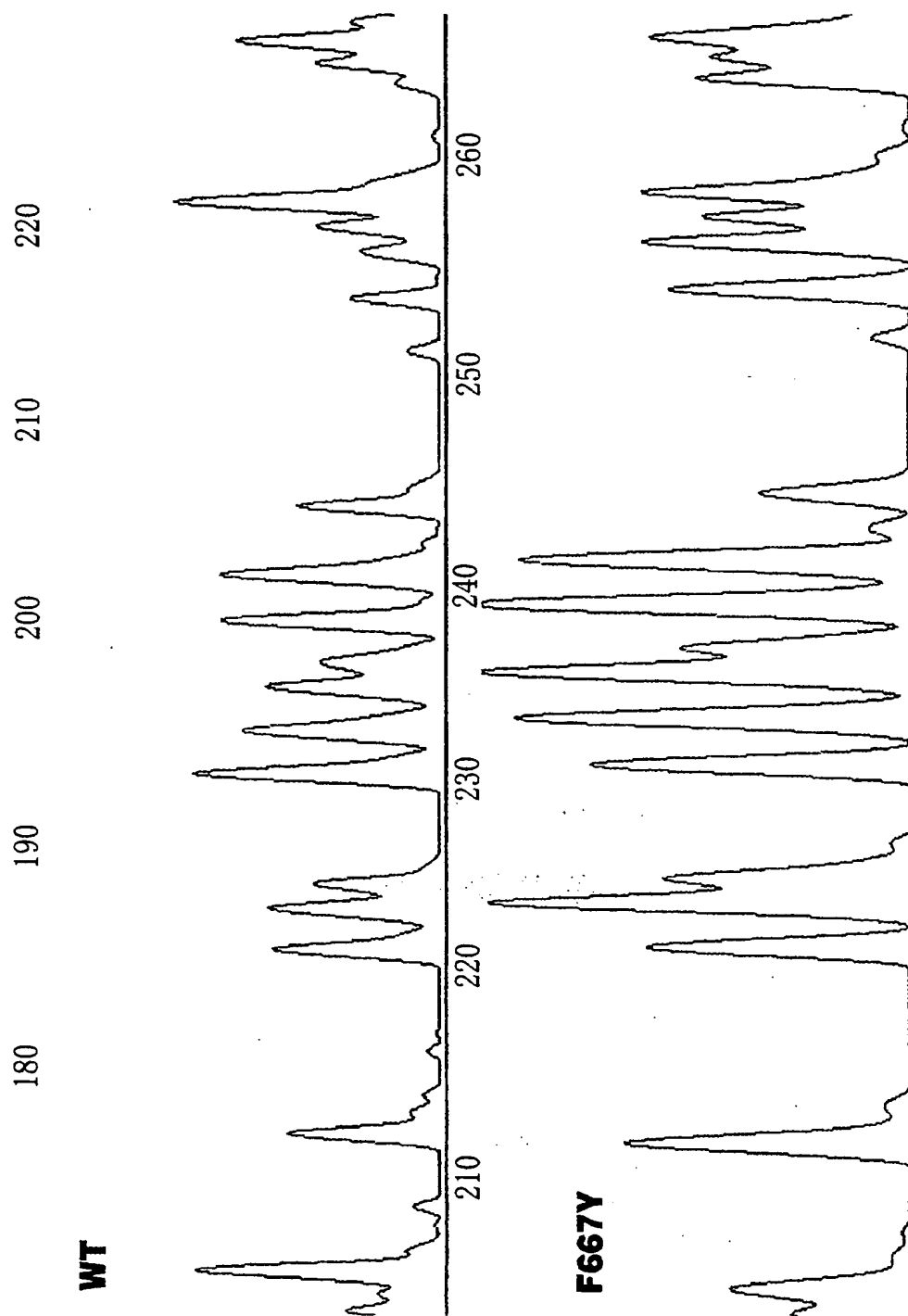
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 1 4



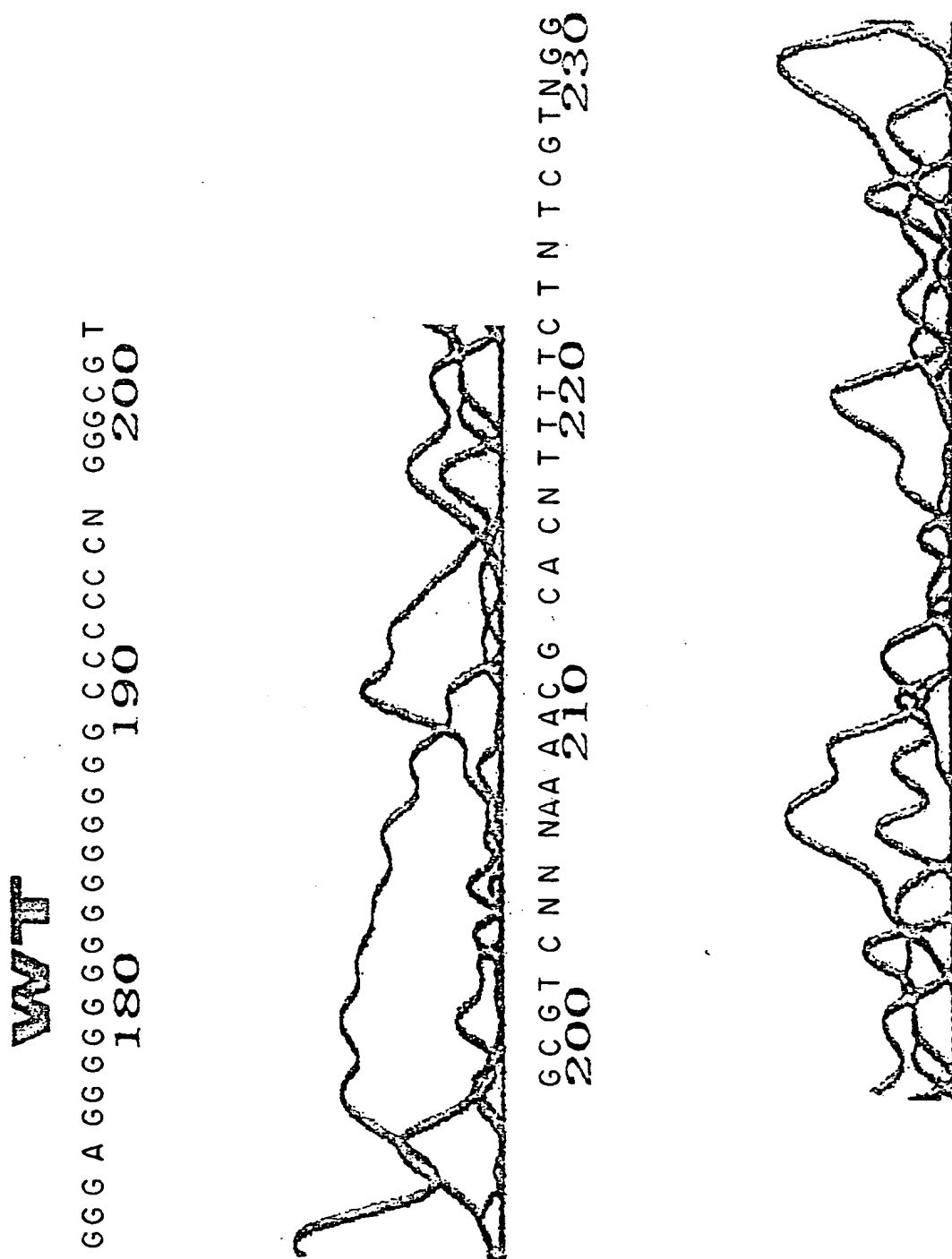
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 1 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

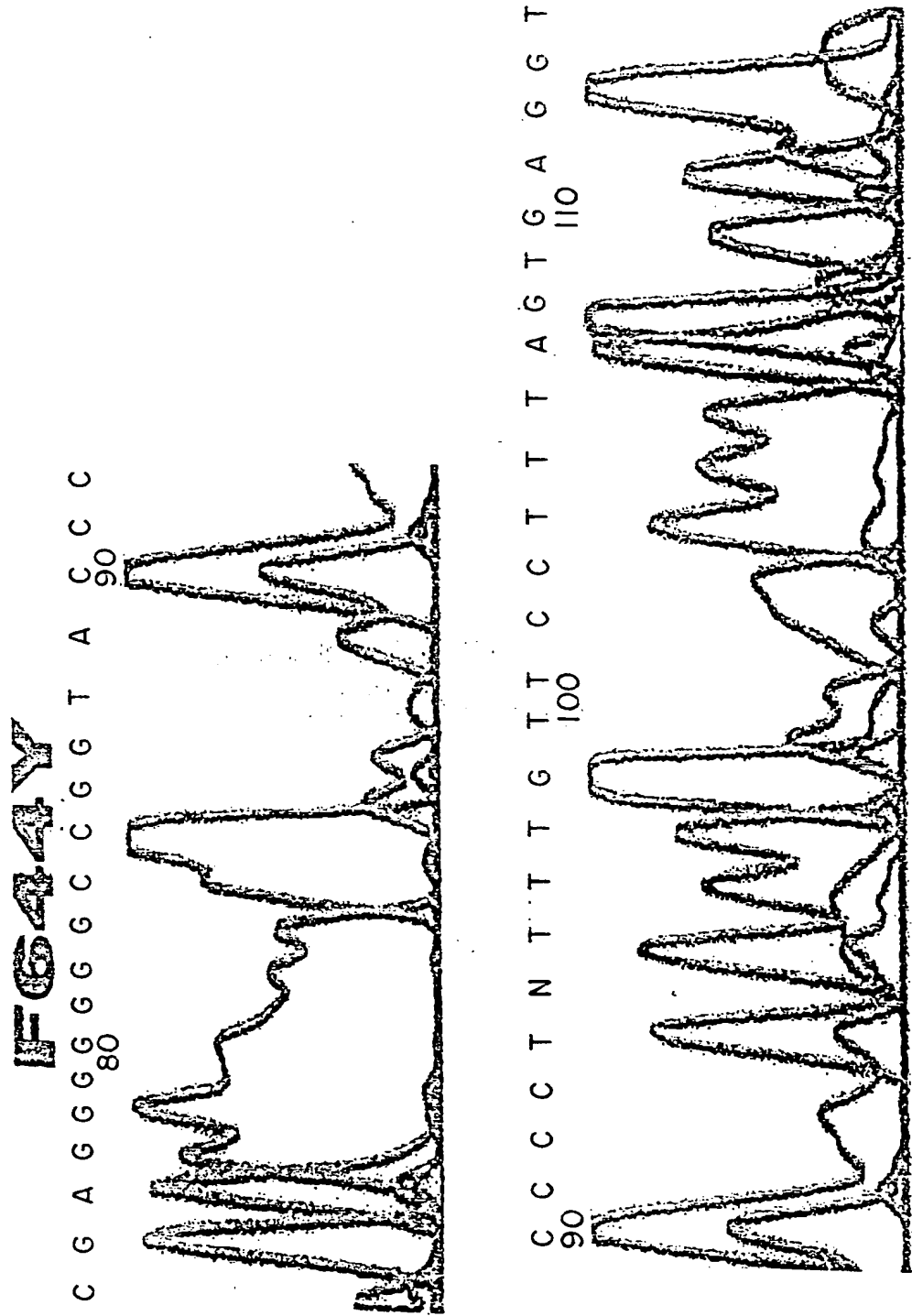
図 1 6



1 6 / 1 / 2 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

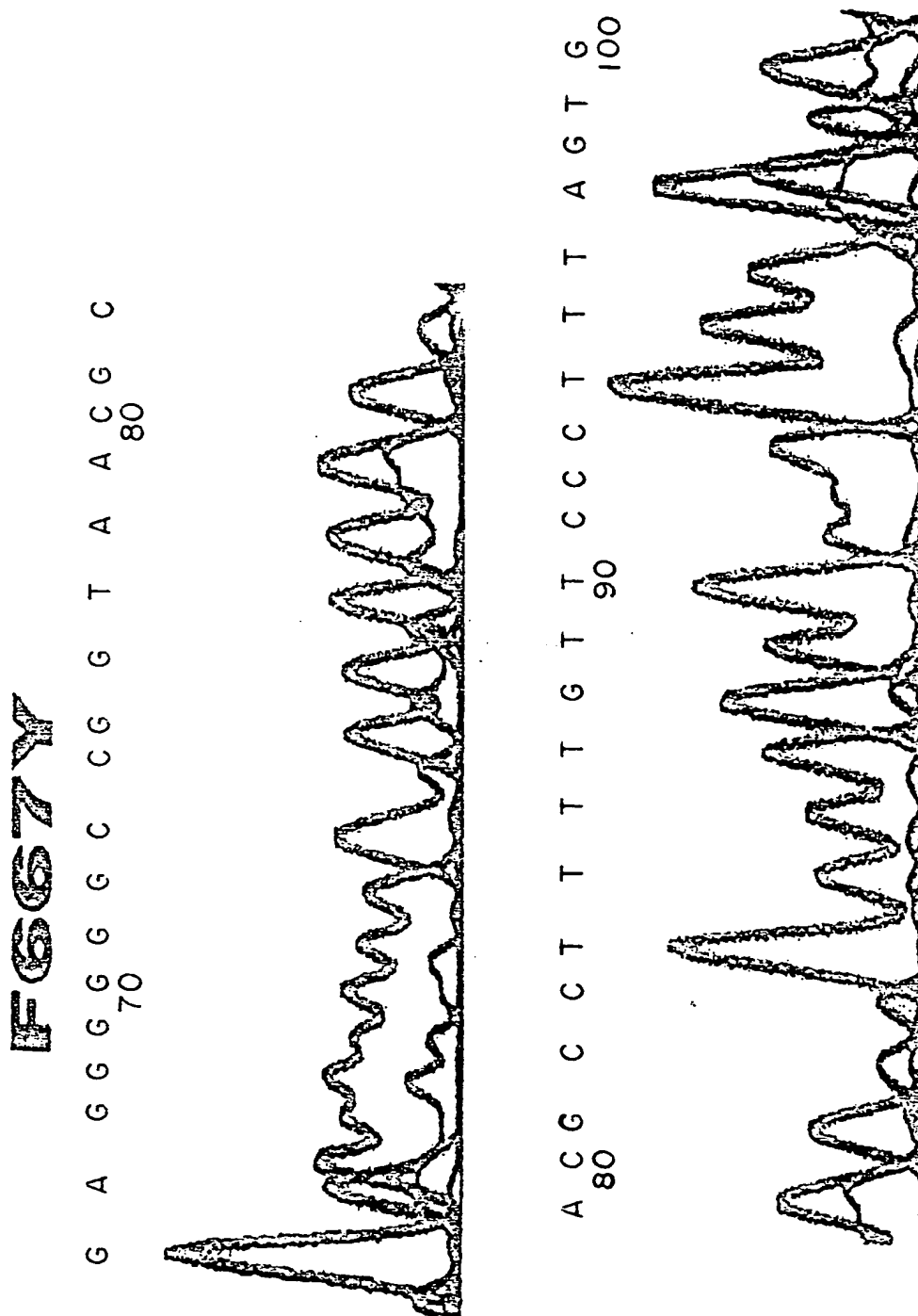
図 16



16 / 2 / 21

THIS PAGE BLANK (USPTO)

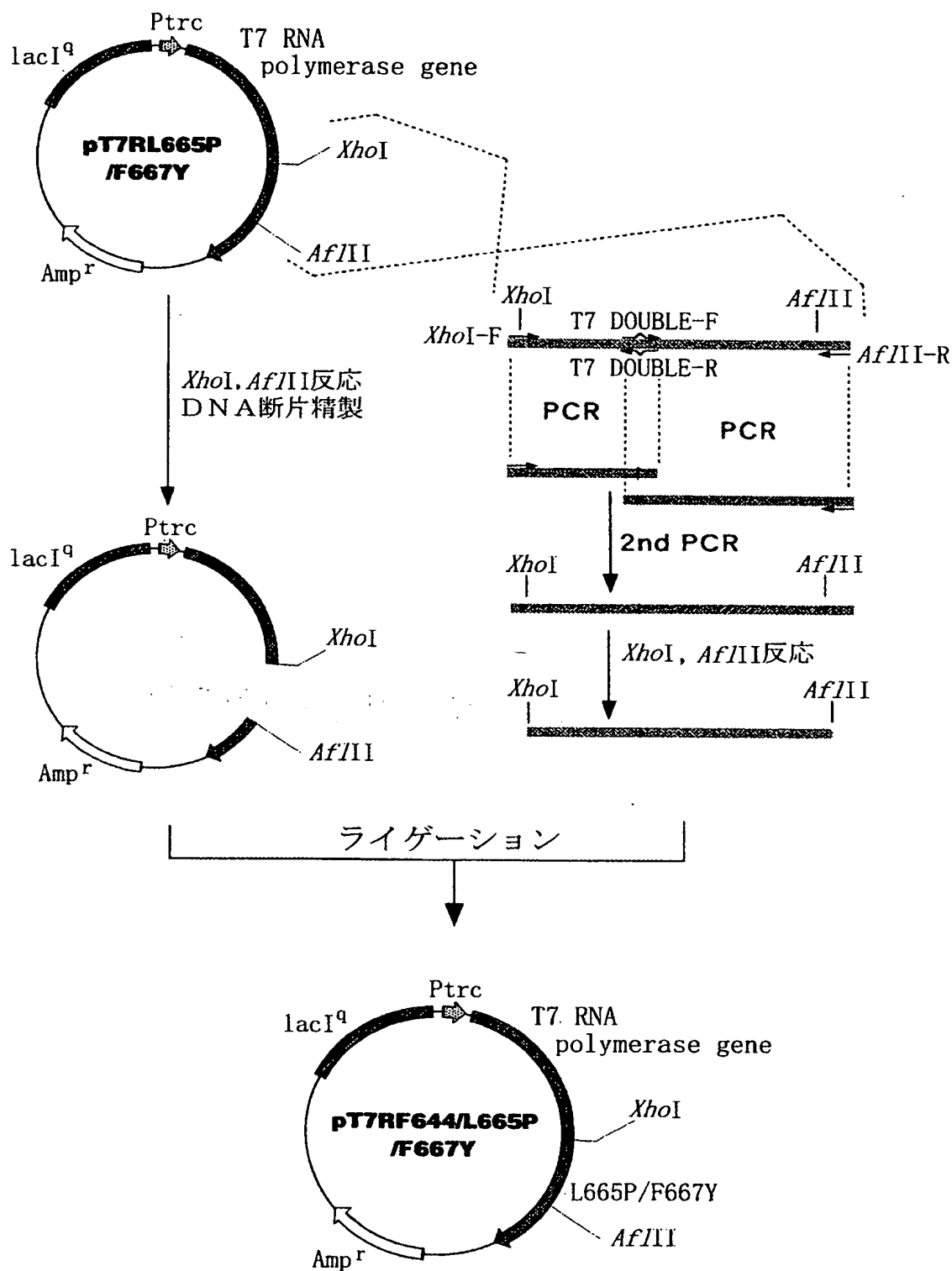
図 16



16 / 3 / 21

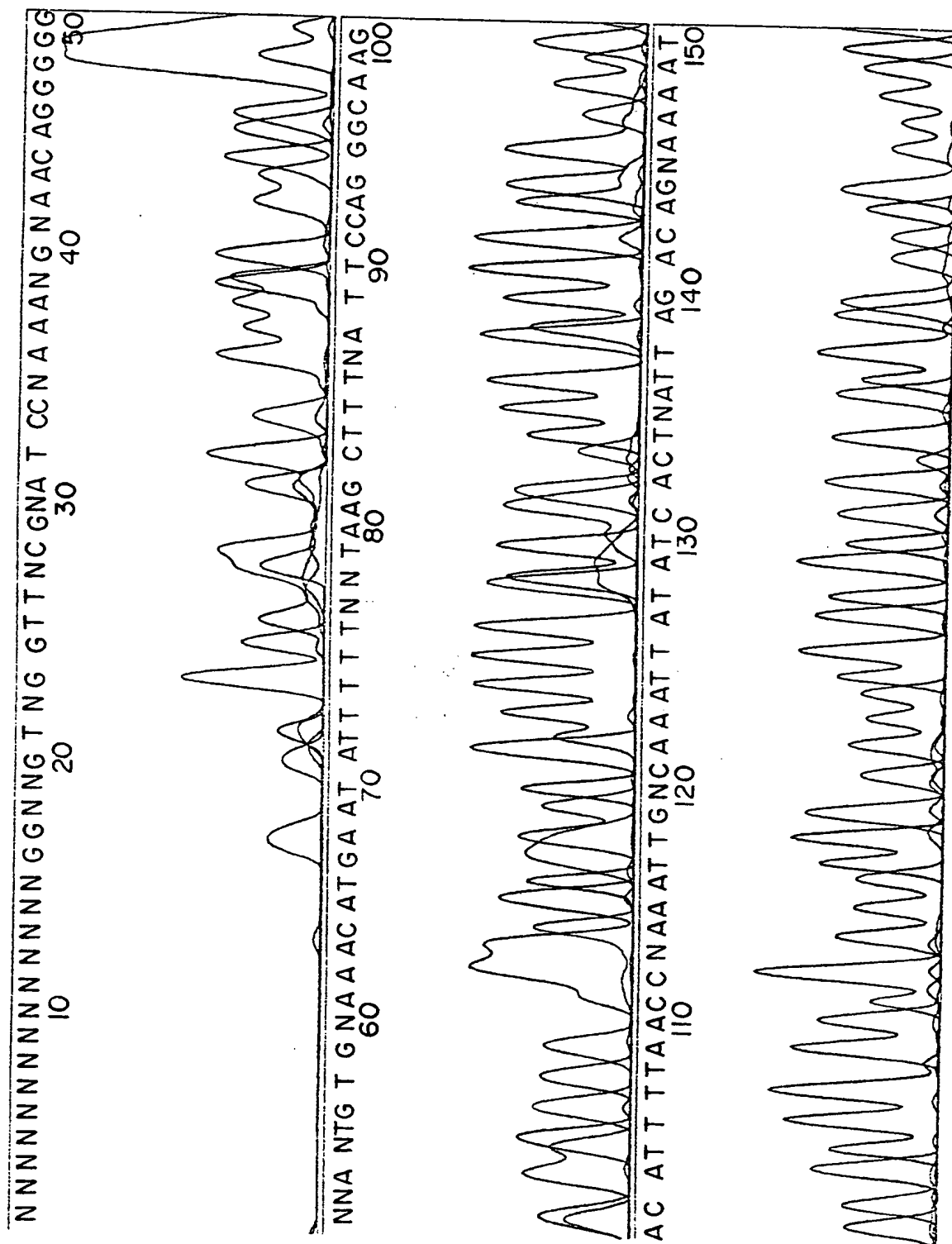
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 17



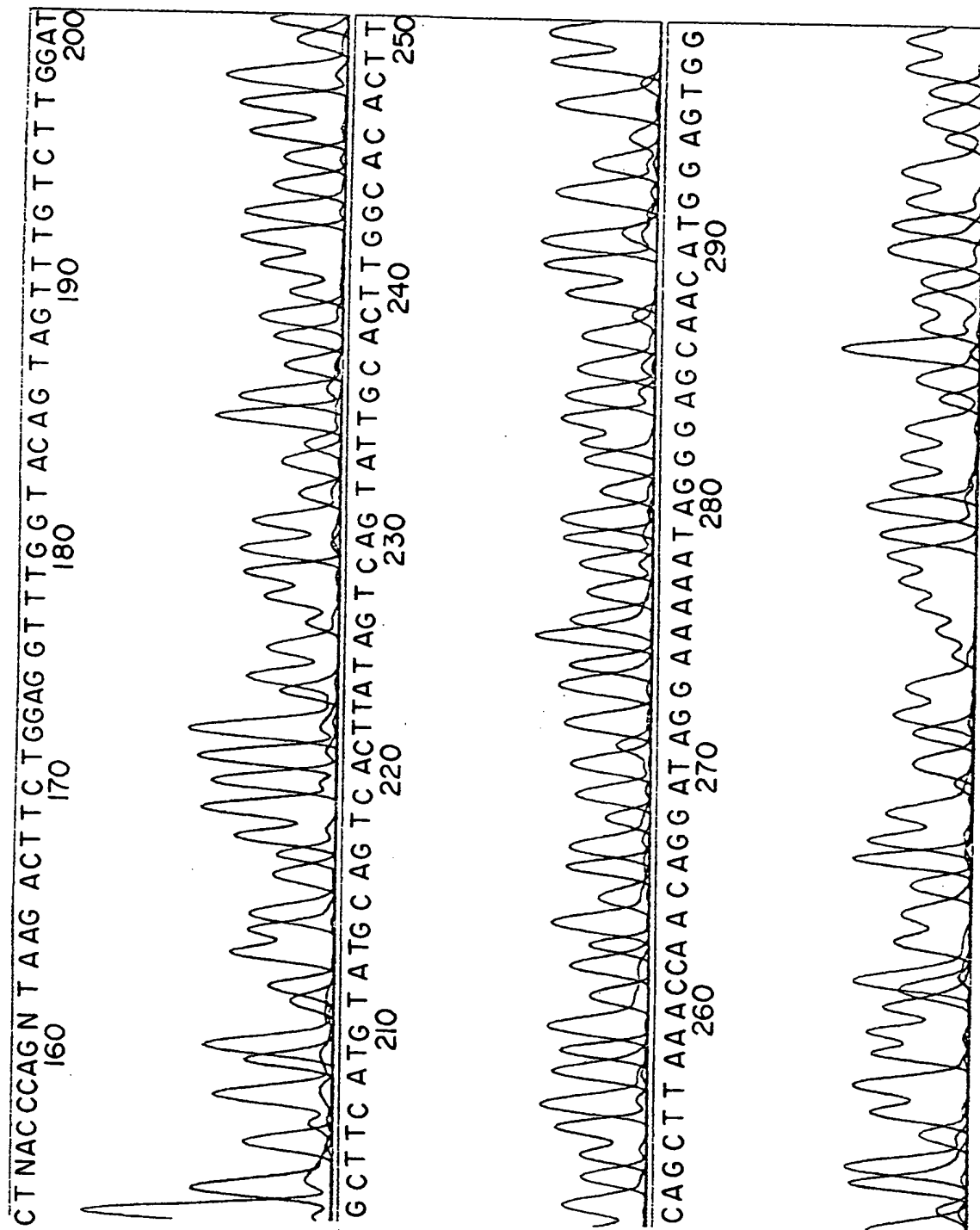
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 18
(1)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

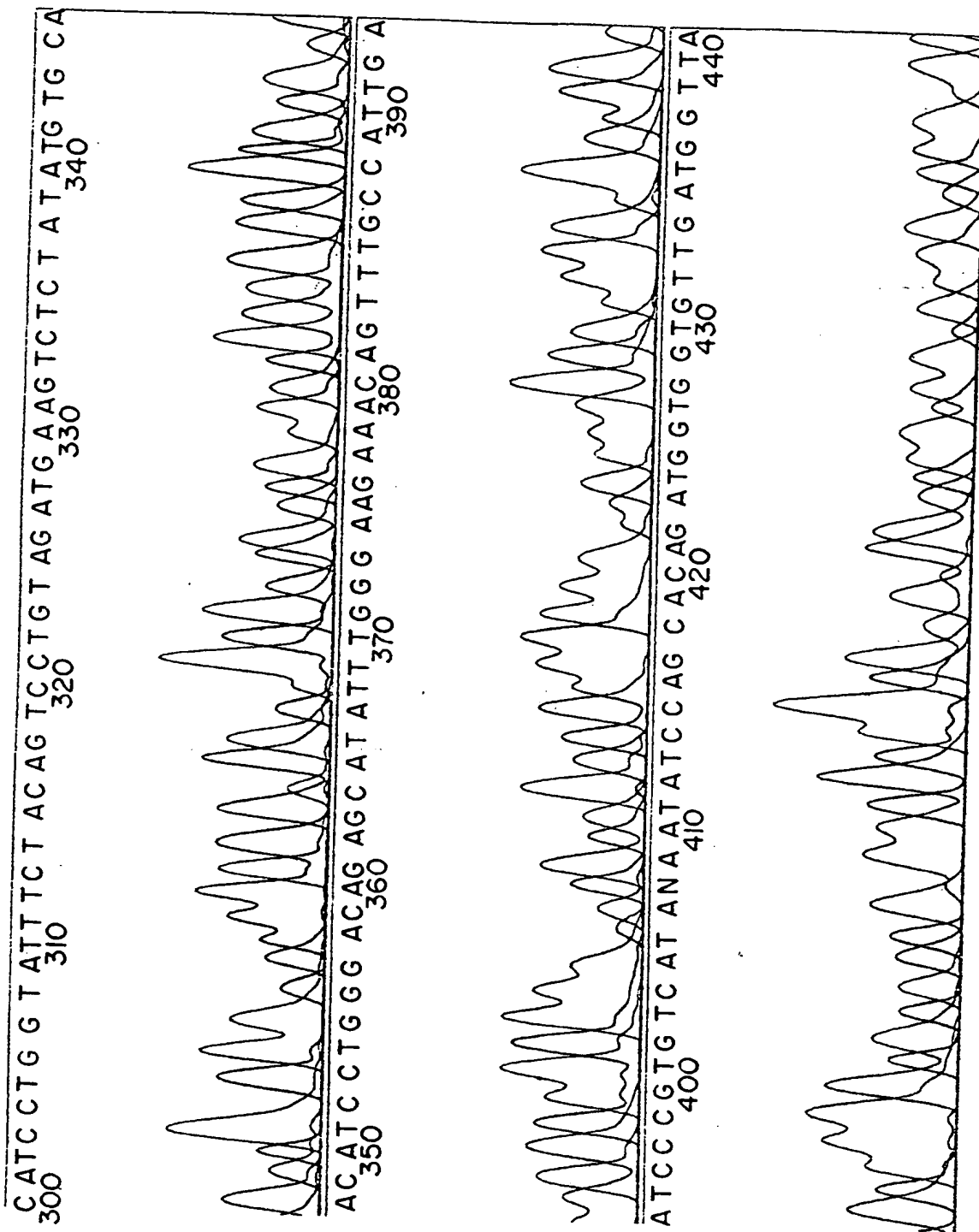
18
(2)



19 / 21

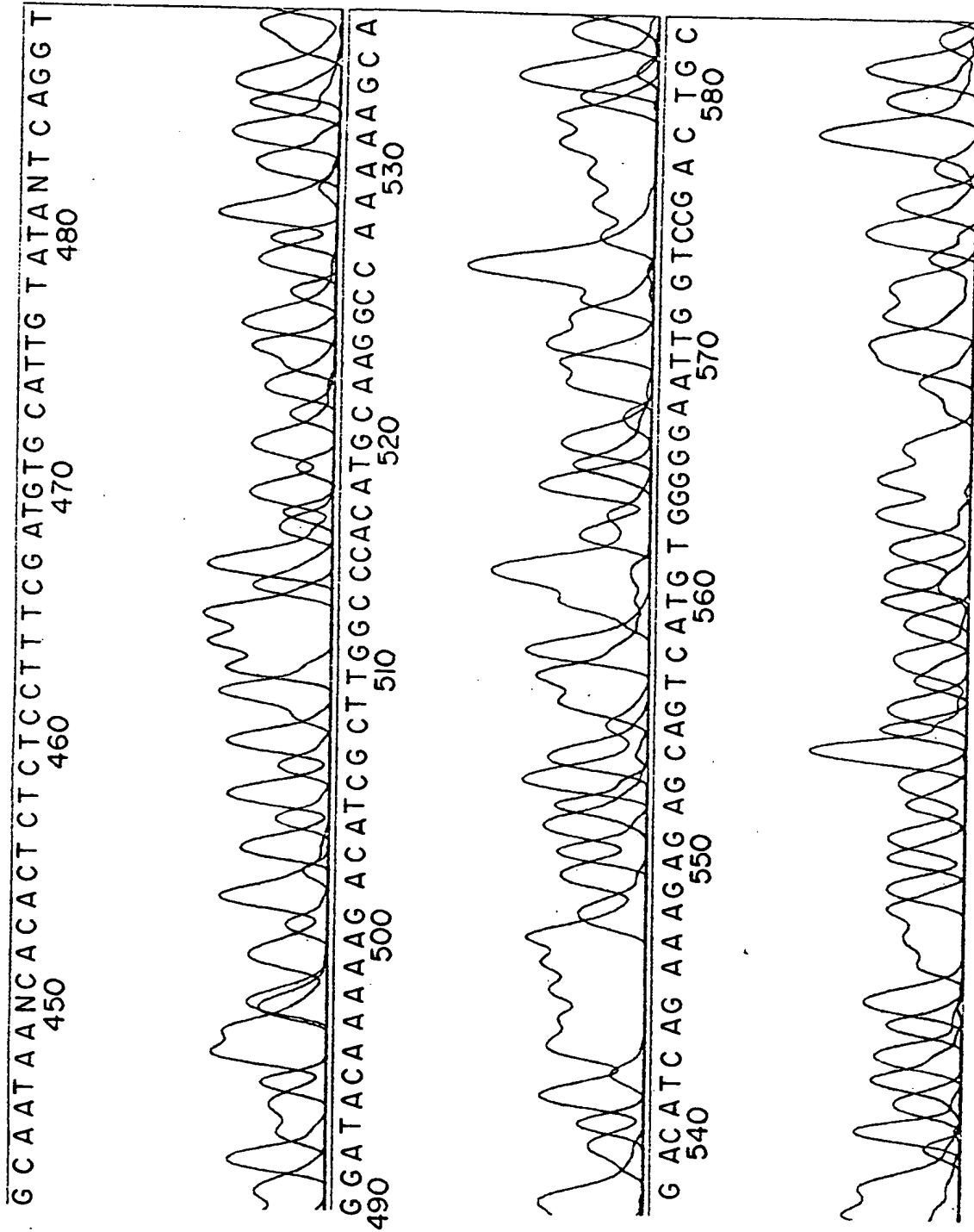
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 18
(3)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 18
(4)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブタベスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE ~~INTERNATIONAL~~
RECOGNITION OF THE ~~DEPOSIT~~ OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

issued pursuant to Rule 7. 1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 株式会社ニッポンジーン
代表取締役 米田 祐康 殿
寄託者 あて名 〒 東京都新宿区若葉 1 丁目 4 番地 金剛ビル

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) pT7RF644Y/L665P/F667Y (DH5α)	(受託番号) FERM BP- 6364
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 10 年 5 月 20 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日 に原寄託よりブダベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology 所長 大箸 信 Dr. Shinobu Oshigahara Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN 平成 10 年 (1998) 5 月 20 日	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

原寄託についての受託証

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

氏名 (名称)

株式会社ニッポンジーン

代表取締役 米田 祐康

寄託者

あ て 名 〒 160

東京都新宿区若葉 1 丁目 4 番地 金剛ビル

殿

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

pT7RF644Y (DH5α)

(受託番号)

FERM BP- 5998

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 9 年 6 月 27 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。
そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

所 長 大石 道夫

Michio Oishi, Ph.D., DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 9 年 (1997) 7 月 2 日

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON ~~THE~~ ~~INTERNATIONAL~~
RECOGNITION OF ~~THE~~ ~~DEPOSIT~~ OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名 (名称) 株式会社ニッポンジーン
代表取締役 米田 祐康 殿
寄託者
あ て 名 〒 160
東京都新宿区若葉1丁目4番地 金剛ビル

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

PT7RL665P/F667Y (DH5α)

(受託番号)

FERM BP- 5999

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- ☒ 科学的性質
- ☒ 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 9 年 6 月 27 日 (原寄託日) に受領した1欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に1欄の微生物を受領した。
そして、 年 月 日 に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

所 長 大石 道夫

Michio Oishi, Ph.D., DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305)
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 9 年 (1997) 7 月 2 日

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03037

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12Q1/68, C12P19/34 //
(C12N9/12, C12R1:19) (C12N1/21, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12Q1/68, C12P19/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIL (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 8-205874, A (President & Fellows of Harvard College), 13 August, 1996 (13. 08. 96) & EP, 655506, A1 & WO, 96/12042, A3 & US, 5614365, A	1-25
A	WO, 96/14434, A1 (The Institute of Physical and Chemical Research), 17 May, 1996 (17. 05. 96) & EP, 785278, A1 & JP, 8-515194, A	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
8 October, 1998 (08. 10. 98)

Date of mailing of the international search report
20 October, 1998 (20. 10. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12Q1/68, C12P19/34 // (C12N9/12, C12R1:19) (C12N1/21, C12R1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/54, C12N9/12, C12N1/21, C12Q1/68, C12P19/34

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIL (DIALOG)

BIOSIS (DIALOG)

REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 8-205874, A (プレジデント・アンド・フェローズ・オブ・ハーバード・カレッジ) 13.8月.1996 (13.08.96) & EP, 655506, A1 & WO, 96/12042, A3 & US, 5614365, A	1-25
A	WO, 96/14434, A1 (理化学研究所) 17.5月.1996 (17.05.96) & EP, 785278, A1 & JP, 8-515194, A	1-25

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.10.98

国際調査報告の発送日

20.10.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

THIS PAGE BLANK (USPTO)